

Nachweis methylierter chromosomaler Regionen mit methylspezifischer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Antje Kaiser**
geboren am 21. April 1978 in Zwickau

24. April 2005

Erster Gutachter: Prof. Dr. U. Claussen, Jena
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Dieckmann, Jena
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Bullerdieck, Bremen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 5. April 2005

Für meine Eltern

1 Inhaltsverzeichnis

2	Zusammenfassung	4
3	Einleitung.....	6
3.1	Historische Entwicklung der Humangenetik.....	7
3.2	DNA-Methylierung	8
3.2.1	Funktionen der DNA-Methylierung	10
3.2.2	DNA-Methylierung in der Tumorgenese	11
3.2.3	DNA-Methylierung im Alter	13
3.2.4	Der Mechanismus der Geninaktivierung.....	14
3.2.5	Genetische Erkrankungen aufgrund von Methylierungsstörungen	15
3.3	Chronisch-Myeloische Leukämie	16
3.4	Molekulargenetische Methoden.....	18
3.4.1	Natriumbisulfitreaktion und methylspezifische Polymerasekettenreaktion..	18
3.5	Molekularzytogenetische Methoden	20
3.5.1	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.....	20
3.5.2	Comparative Genomic Hybridisation	21
3.5.3	Methoden zur Markierung von DNA-Proben für FISH und CGH.....	22
3.6	Überlegungen zum Versuchsaufbau	23
4	Zielstellung	26
5	Material und Methoden	27
5.1	Molekulargenetische Methoden.....	27
5.1.1	Probenmaterialien	27
5.1.2	Lymphozytenkultur und DNA-Isolation.....	27
5.1.3	Natriumbisulfitreaktion	28
5.1.4	Methylspezifische Polymerasekettenreaktion (MSP)	29
5.1.5	Gelelektrophorese	32
5.1.6	Reagenzien und Geräte.....	32
5.2	Molekularzytogenetische Methoden	35
5.2.1	Vorbereitung der Metaphasepräparate.....	35
5.2.1.1	Auftropfen der Zellsuspension auf den Objektträger	36
5.2.1.2	Pepsindigestion und Fixierung.....	36
5.2.2	Markierung der genomischen DNA-Sonden	37

5.2.2.1	Nick - Translation.....	37
5.2.2.2	PCR mit degenerierten Oligonukleotidprimern	38
5.2.2.3	Bestimmung der Fragmentlängen und Reinigung der Sonden-DNA	41
5.2.3	Die eigentliche <i>in situ</i> Hybridisierung.....	42
5.2.3.1	Denaturierung der Metaphase-Präparate	42
5.2.3.2	Prähybridisierung der DNA-Sonden	43
5.2.4	Posthybridisierungswaschungen	44
5.2.5	Detektion, Gegenfärbung und Aufnahme	44
5.2.5.1	Detektion	44
5.2.5.2	Gegenfärbung.....	45
5.2.5.3	Aufnahme	46
5.2.6	Comparative Genomic Hybridization	46
5.3	Bisulfitreaktion und Hybridisierung an Metaphasechromosomen	47
5.4	Reagenzien und Geräte.....	49
6	Ergebnisse.....	53
6.1	Molekulargenetische Methoden.....	53
6.1.1	Natriumbisulfitreaktion und methylspezifische Polymerasekettenreaktion..	53
6.2	Zytogenetische Methoden	54
6.2.1	Die Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.....	54
6.2.1.1	Intensität des Fluoreszenzsignals von Chromosomenpaaren einer Metaphase.....	54
6.2.1.2	Intensität des Fluoreszenzsignals von homologen Chromosomen.....	55
6.2.1.3	Zuordnung des Fluoreszenzsignals zu chromosomalen Regionen	56
6.2.2	Comparative Genomic Hybridization	66
6.2.2.1	CGH mit Natriumbisulfit behandelter Normal-DNA	67
6.2.2.2	CGH mit Natriumbisulfit behandelter Normal-DNA und CML-DNA	68
6.2.3	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung von Tumorzelllinien	70
6.3	Natriumbisulfitreaktion auf Metaphasechromosomen	72
7	Diskussion	73
7.1	Molekulargenetische Methoden.....	73
7.1.1	Natriumbisulfitreaktion und methylspezifische Polymerasekettenreaktion...	73
7.2	Molekularzytogenetische Methoden	74
7.2.1	Die Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.....	74

7.2.1.1	Intensitätsvergleich von chromosomalen Fluoreszenzsignalen	75
7.2.1.2	Zuordnung des Fluoreszenzsignals zu chromosomalen Regionen	75
7.2.2	Comparative Genomic Hybridization	81
7.2.2.1	CGH mit Natriumbisulfit behandelte DNA aus Normalsuspension	82
7.2.2.2	CGH mit Natriumbisulfit behandelte DNA aus Normalsuspension und CML-DNA	83
7.2.3	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung von Tumorzelllinien	85
7.2.3.1	Ergebnisse der Varianz der Reaktionsparameter	86
7.3	Natriumbisulfitreaktion von Metaphasechromosomen	87
8	Schlußfolgerungen	89
9	Literatur- und Quellenverzeichnis	90
10	Anhang	100

2 Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden epigenetische Phänomene immer häufiger Thema in Studien zur Untersuchung von Tumorerkrankungen. Auch die DNA-Methylierung wird zu diesen Modifikationen gezählt, welche die Basensequenz nicht verändern. Die Zunahme methylierter Cytosine wird oft in den Promotoren inaktivierter regulatorischer Gene, z. B. in Tumorsuppressorgenen, beobachtet (Jones and Laird, 1999). Ein Verlust der Methylierung kann zu einer Aktivierung von Onkogenen oder zu einer chromosomalen Instabilität führen (Lengauer et al., 1997; Chen et al., 1998). Auch in supprimierten repetitiven DNA-Sequenzen (Singal und Ginder, 1999; Robertson und Wolffe, 2000), in geprägten genomischen Bereichen (genomic imprinting, Esteller und Herman, 2002) und auf dem inaktiven X-Chromosom bei Frauen (Attwood et al., 2001) sind hypermethylierte Regionen vorhanden.

Der Nachweis spezifischer DNA-Methylierungsmuster ist eine vielversprechende Strategie zur Tumorsuche und -charakterisierung, denn diese Muster sind stabil, amplifizierbar und werden schon in einem frühen Stadium der Karzinogenese häufig beobachtet (Baylin et al., 2001).

Der Methylierungsgehalt einzelner genomischer Sequenzen kann zum Beispiel mit Bisulfitsequenzierung (Frommer et al., 1992; Clark et al., 1994) oder mit methylspezifischer Polymerasekettenreaktion (MSP, Herman et al., 1996) analysiert werden. Für genomweite Untersuchungen stehen aufwendige Verfahren mit Antikörpern (Barbin et al., 1994) oder methylbindenden Säulen (Brock et al., 1999) zur Verfügung. Die vorliegende Arbeit etabliert eine einfach durchzuführende Nachweismethode für chromosomale methylierte Regionen auf der Grundlage der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH).

Als Versuchsproben wurden jeweils die gesamte genomische DNA aus kultivierten Lymphozyten gesunder Probanden, von Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie (CML) sowie gesamtgenomische DNA einer Tumorzelllinie aus einem kolorektalen Karzinom (Colo 320) verwendet. In der zunächst durchgeführten Natriumbisulfitreaktion erfolgte eine Konvertierung von unmethylierten Cytosinen in Uracile, während die methylierten Basen unverändert blieben (Clark et al., 1994). Anschließend konnte mit MSP die Umwandlung dokumentiert werden. Da in der anschließenden Hybridisierung der markierten gesamtgenomischen DNA-Sonden

nur unveränderte DNA-Sequenzen mit der Ziel-DNA auf den Metaphasenplatten hybridisieren konnten, wurden methylierte Bereiche durch Fluoreszenzsignale detektiert. Es erfolgten insgesamt 202 Natriumbisulfitreaktionen und 150 MSP. In den FISH-Versuchen konnten 20 Metaphasen der DNA aus Normalsuspension, 20 Metaphasen der CML-DNA, 25 CGH-Karyogramme und 5 Metaphasen mit Zelllinien-DNA ausgewertet werden.

In den Versuchen mit der DNA gesunder Probanden konnten reproduzierbare Muster von methylierten Regionen im Genom beschrieben werden, welche auch mit anderen Methoden nachweisbar waren (Barbin et al., 1994; Brock et al., 1999). Besonders lange Sequenzen mit einer hohen Zahl an methylierten Cytosinen wie die heterochromatischen Regionen der Chromosomen 1, 9, 16; die Telomerbanden von Chromosom 1 sowie die kurzen Arme der Chromosomen 13, 14 und 15 waren eindeutig identifizierbar. Mit Comparative Genomic Hybridisation (CGH) gelang anschließend teilweise die objektive Bestätigung der mit FISH erzielten Ergebnisse. Der Vergleich von gesamtgenomischer DNA gesunder Probanden und von CML-Patienten zeigte eine unterschiedliche Verteilung von methylierten Bereichen in beiden Genomen. Im Zentromerbereich von Chromosom 1 (1p11-13), in den kurzen Armen der Chromosomen 13, 14, 15 sowie im kurzen Arm des Chromosoms 19 des CML-Genoms wurden bis jetzt keine Änderungen des Methylierungsstatus dieser Regionen beschrieben. Die Beurteilung der Signaldifferenzen jedoch ist und bleibt schwierig. In den Versuchen mit gesamtgenomischer DNA der Tumorzelllinie Colo 320 wurden signalstarke Regionen nachgewiesen, welche bereits von Quinn et al., 1979 als HSR (homogeneously stained regions, homogen gefärbte Regionen) beschrieben wurden. Sie zeigten vor und nach Behandlung mit Natriumbisulfit keine Änderung der Signalintensität. Bei der Durchführung der Natriumbisulfitreaktion direkt auf Metaphasechromosomen wurde eine erhebliche Destruktion der chromosomalen Strukturen beobachtet, welche keine Aussage über die Methylierungsgrad des Genoms ermöglichte.

Die methylspezifische Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung könnte nach weiterer Optimierung eine vielversprechende Methode zur Untersuchung methylierter chromosomaler Regionen sein. Nach Erstellung von spezifischen Methylierungsmustern ist so eine individuelle Therapie zahlreicher Erkrankungen möglich.

3 Einleitung

Epigenetische Phänomene, zu denen auch die DNA-Methylierung gehört, regulieren die Transkriptionsaktivität von Genen, ohne die Basensequenz zu ändern. Die Methylierung erfolgt dabei an Cytosinen in Cytosin-Guanosin-Dinukleotiden (CG-Dinukleotide), welche im gesamten Genom verteilt sind (Robertson und Wolffe, 2000). Die Auswirkungen dieses Prozesses sind vielfältig. Die Zunahme methylierter Basen im Promotorbereich eines Gens kann meist mit dem Funktionsverlust dieses Gens gleichgesetzt werden, was einer Mutation oder einer Deletion entspricht (Costello und Plass, 2001). In zahlreichen Neoplasien wurde die Inaktivierung von Tumorsuppressorgen durch Hypermethylierungen und damit der Verlust der normalen Zellzykluskontrolle nachgewiesen (Jones and Laird, 1999). Auch im inaktiven X-Chromosom bei Frauen zeigte sich eine starke Zunahme des Methylierungsgehaltes (Attwood et al., 2001). Eine Abnahme der Zahl methylierter Basen kann eine Aktivierung von Onkogenen oder durch Chromatinveränderungen eine Instabilität des gesamten Genoms zur Folge haben (Lengauer et al., 1997; Chen et al., 1998).

Um den Methylierungsstatus einer genomischen Region messen zu können, wurden zahlreiche Verfahren beschrieben. Einzelne DNA-Bereiche können mit methylspezifischer Polymerasekettenreaktion (MSP, Herman et al., 1996) und mit Sequenzierung nach Natriumbisulfitreaktion (Clark et al., 1994) beurteilt werden. Für genomweite Untersuchungen stehen bisher keine einfach durchzuführenden Methoden zur Verfügung, die gleichzeitig eine chromosomale Lokalisation der entsprechenden Regionen ermöglichen.

3.1 Historische Entwicklung der Humangenetik

Die Humangenetik hat im Vergleich zu anderen Naturwissenschaften eine recht junge Geschichte, ist sie doch wie kaum eine andere von den technischen Möglichkeiten der Zeit abhängig. Im Zuge der Weiterentwicklung dieser Voraussetzungen sind die in den letzten Jahren erzielten Fortschritte dafür umso erstaunlicher.

Die ersten Beschreibungen von Chromosomen als stark gefärbte Strukturen in sich teilenden Zellen (grch. *chroma* – Farbe, grch. *soma* – Körper) reichen bis in das 19. Jahrhundert zurück. Es vergingen anschließend mehrere Jahrzehnte, bis die Funktion der DNA als Träger der genetischen Information (Avery et al., 1944) und ihre chemische Struktur als Doppelhelix (Watson und Crick, 1953) gezeigt werden konnte. 1956 gelang Tjio und Levan erstmals die genaue Bestimmung der Anzahl ($n=46$) und die morphologische Beschreibung der menschlichen Chromosomen. Der Nachweis des Down-Syndroms (Lejeune et al., 1959) und des Turner-Syndroms (Ford et al., 1959) als genetisch bedingte Erkrankungen markierte den Beginn der klinischen Genetik. Mit der Entdeckung spezifischer Bandenmuster mit Quinacrine (Casperson et al., 1968) oder mit Giemsa (Seabright, 1971) konnte jedes Chromosom anhand seiner Banden eindeutig identifiziert werden. Die Giemsa-Bänderung stellt bis heute eine Standardtechnik der Zytogenetik dar. Durch den Einsatz von Restriktionsendonukleasen gelangen 1973 erste Klonierungsversuche von DNA in Plasmidvektoren (Cohen et al., 1973). Dies war der Beginn einer bis heute viel diskutierten Methode der Humangenetik.

In den letzten beiden Jahrzehnten ging die Entwicklung neuer Techniken rasant vorwärts: 1981 konnten erstmals Einzelkopie-Gene mit Hilfe von radioaktiv markierten Sonden durch *in situ* Hybridisierung lokalisiert werden (Gerhard et al., 1981; Harper und Saunders, 1981; Malcolm et al., 1981). Die Beschreibung der Polymerasekettenreaktion (PCR, Saiki et al., 1986), der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH, Pinkel et al., 1986), der PCR mit degenerierten Oligonukleotidprimern (DOP-PCR, Telenius et al., 1992) und der vergleichenden Genomhybridisierung (Comparative Genome Hybridisation, CGH) durch Kallioniemi und Mitarbeiter 1992 bedeuteten eine enorme Erleichterung von Forschungs- und Routinearbeiten.

Um eine international identische Darstellung zu erreichen, orientiert sich die Nomenklatur weltweit an der Giemsa-Bänderung und ist im „International system for human cytogenetics nomenclature (=ISCN) 1995“ (Mittelman, 1995) zusammengefaßt.

3.2 DNA-Methylierung

Ein besonderes Charakteristikum von Vertebraten-Genomen sind methylierte Nukleotide, die erstmals 1948 mit der Entdeckung der "fünften Base" 5-Methylcytosin in den Mittelpunkt des Interesses rückten (Hotchkiss, 1948). Seitdem wurde die regulatorische Funktion der DNA-Methylierung bei der embryonalen Entwicklung und Zelldifferenzierung, in geprägten Genen (Imprinting) und auf dem inaktiven X-Chromosom bei Frauen vielfach untersucht und präzisiert. Auch wenn der Methylierungsstatus einer genomischen Region meist über viele Zellgenerationen erhalten bleibt, können unmethylierte Cytosine methyliert und Methylgruppen verloren werden (Singal und Ginder, 1999).

Bis auf wenige Ausnahmen kann man davon ausgehen, daß eine Hypermethylierung in bestimmten Genregionen einer Abschaltung dieser Gene entspricht und ein Verlust von Methylgruppen eine Erhöhung der Expressionsrate bewirkt (Costello und Plass, 2001). In den letzten Jahren wurden vor allem die Untersuchungen zur Methylierung im Tumorgenom intensiviert. In zahlreichen Neoplasien konnte neben einer Hypermethylierung in den Promotorbereichen vieler tumorrelevanter Gene (Jones and Laird, 1999; Baylin und Herman, 2000) auch eine genomweite Demethylierung nachgewiesen werden (Feinberg und Vogelstein, 1983; Robertson und Wolffe, 2000; Esteller und Herman, 2002). Die Hypermethylierung bewirkt dabei einen Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen (Jones und Laird, 1999) und Reparaturgenen (mismatch-repair-genes, Esteller et al., 1998; Herman et al., 1998), während die globale Verringerung des Methylierungsgrades zu Defekten der chromosomalen Integrität führen kann (Lengauer et al., 1997). Ist die Demethylierung im Bereich von Protoonkogenen lokalisiert, hat dies eine Aktivierung dieser Gene zur Folge (Chen et al., 1998; Singal und Ginder, 1999; Frühwald und Plass, 2002). Dies alles sind Prozesse, deren Wirkung einer Mutation oder Deletion entsprechen und

die zu einer Tumorprogression beitragen. Da dabei keine Änderung der Nukleotidsequenz erfolgt, wird die Methylierung zu den epigenetischen Phänomenen des Genoms gezählt. Auch die Änderung von Chromatinstruktur und der Replikationszeitpunkt gehören zu diesen globalen Mechanismen der Genkontrolle. Ob nun aber der Funktionsverlust eines Genes durch die Änderung des Methylierungsstatus in der assoziierten Promotorregion bedingt wird oder ob die Methylierung eine Folge der Genabschaltung ist, bleibt weiterhin ungeklärt.

Cytosinmethylierung und CpG-Inseln

5-Methylcytosin entsteht durch die Addition von Methylgruppen am Kohlenstoffatom 5 des Cytosinringes im Dinukleotid 5'-CG-3'. Da Cytosin über eine Phosphordiesterbindung mit Guanin verbunden ist, wird dies auch als CpG-Dinukleotid bezeichnet. Sie sind im gesamten Genom verteilt, finden sich aber hauptsächlich in methylierter Form in repetitiven Sequenzen, z.B. ribosomaler DNA, Satellitenregionen, Zentromer-Wiederholungssequenzen, Retrotransposons, *Alu*-Sequenzen und endogenen Retroviren. Die Zahl der CpG-Dinukleotide nimmt durch Mutation und fehlerhafte Reparatur stetig ab. Nur in kurzen DNA-Sequenzen, den CpG-Inseln, sind sie in ihrer ursprünglichen Anzahl vorhanden (Robertson und Wolffe, 2000). Antequera und Bird beschrieben diese Inseln als 1-5 kb lange, besonders GC-reiche DNA-Regionen, die im Promotorbereich oder 1. Exon von ungefähr der Hälfte aller Gene lokalisiert sind (Antequera und Bird, 1993). Die CpG-Dinukleotide in den meisten der insgesamt 45000 CpG-Inseln im Genom sind unmethyliert, unabhängig von der Transkriptionsaktivität der assoziierten Gene. Einzige Ausnahmen sind hypermethylierte CpG-Inseln in geprägten (imprinted) Genen, auf dem inaktivierten X-Chromosom bei Frauen und in Tumorgenomen; (Baylin, 1997; Robertson und Jones, 2000).

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen und BrdU (Bromodeoxyuridine) konnten Craig und Bickmore die Verteilung und den Replikationszeitpunkt von CpG-Inseln im Genom darstellen (Craig und Bickmore, 1994). So finden sich die meisten mit einer Distanz von 15-500 kb zueinander in chromosomalen T-Banden, welche vor allem in genreichen Telomer-Regionen lokalisiert sind und früh in der Synthesephase des Zellzyklus repliziert werden. Die spät replizierenden G-Banden besitzen weniger CpG-Inseln, sind im Gegensatz zu den T-Banden relativ GC-arm und das Chromatin

zeigt einen höheren Kondensationsgrad (Holmquist, 1992; Craig und Bickmore, 1994).

Methylierung von Promotoren allein kann keinen Funktionsverlust eines assoziierten Genes bewirken, vielmehr wird eine Kaskade von Modifikationen initiiert, an deren Ende der Transkriptionsstop steht. Eine zentrale Rolle spielt hierbei die Dynamik des Chromatins, welches je nach Transkriptionsaktivität in einer aktiven "offenen" oder passiven "geschlossenen" Form vorliegt. Das aktive Chromatin ist geringgradig kondensiert, enthält stark azetylierte Histonproteine und wird häufig früh in der S-Phase repliziert (Robertson und Wolffe, 2000). Die Umwandlung in eine inaktive Chromatinstruktur erfolgt durch eine Deazetylierung der Histon-Octamer-Schwänze durch Histondeazetylasen, welche sich in Repressorkomplexen nahe den Promotoren befinden. Diese "geschlossene" Struktur entsteht durch einen höheren Kondensationsgrad des Chromatins, der vielen Komponenten des Transkriptionssystems den Zugriff verweigert.

Der Neu-Methylierungsprozess wird sofort nach der DNA-Synthese durch DNA-Methyltransferasen (DNMTasen) katalysiert, die so für die embryonale Entwicklung, die genomische Prägung (imprinting), die X-Chromosom-Inaktivierung und für die Erhaltung der Methylierung in reifen Zellen unentbehrlich sind (Singal und Ginder, 1999; Robertson und Wolffe, 2000).

3.2.1 Funktionen der DNA-Methylierung

Wie bereits erwähnt, ist die DNA-Methylierung ein entscheidender Faktor bei der **embryonalen Entwicklung und gewebsspezifische Differenzierung**, bei deren Fehlen es zu schweren Entwicklungsstörungen bis hin zum Absterben des Embryos kommen kann. Während der Präimplantation erfolgt eine ausgeprägte genomweite Demethylierung von Einzelgenen und repetitiven Elementen, gefolgt von einer Methylierung fast aller CpG-Dinukleotide außer solchen CpG-Inseln, die zur Zeit der Implantation unmethyliert waren. Somit wird das Methylierungsmuster des Embryos neu festgelegt (Singal und Ginder, 1999).

Die **Inaktivierung eines X-Chromosoms** bei Frauen ist eine methylierungsabhängige Transkriptionsblockade eines der beiden weiblichen X-Chromosomen, womit ein gleiches Maß an Genexpression bei Männern und Frauen

bewirkt wird (Attwood et al., 2001). Der genaue Mechanismus dieser Blockade ist immer noch unbekannt (Frühwald und Plass, 2002). Im Gegensatz zu anderen chromosomalen Bereichen ist die Methylierung hier nicht reversibel, das inaktivierte X-Chromosom konnte nur in vitro durch Behandlung mit S-Acetylcystein aktiviert werden (Plass und Soloway, 2002).

Genomische Prägung (Imprinting) beschreibt die selektive Expression des väterlichen oder des mütterlichen Allels eines Gens. Die Blockade des nicht exprimierten Allels erfolgt durch DNA-Methylierung in einem frühen Entwicklungsstadium (Esteller und Herman, 2002). So wird im Falle des Wachstumsfaktorgens *IGF2* (insulin-like growth factor) nur das paternale Allel und beim *IGF2-Rezeptor*-Gen nur das maternale Allel exprimiert (Tycko, 1994).

Eine weitere Funktion der Methylierung ist die **Kontrolle parasitärer DNA-Elemente**, die mehr als 35% des Genoms ausmachen und eine signifikante Bedrohung für die strukturelle Integrität des Genomes darstellen. Zu ihnen gehören neben Viren und Retrotransposons (mobile genetische Bereiche) auch *Alu*-Elemente. Diese Elemente, deren Sequenz erstmals mittels der Restriktionsendonuklease *Alu1* gezeigt werden konnte, kommen im menschlichen Genom sehr häufig vor. Parasitäre Sequenzen können Rekombinationen zwischen repetitiven Sequenzen vermitteln, die chromosomale Rearrangements oder Translokationen verursachen. Aktive Retrotransposons können in Gene eingebaut werden und diese auseinanderbrechen lassen. Durch methylierte CpG-Dinukleotide in ihren Promotoren werden und bleiben diese Elemente inaktiv. Auch in ein Genom eindringende, fremde DNA wird so blockiert. Eine Hemmung dieser Methylierung ist somit Voraussetzung für den Einbau und die Funktion therapeutisch eingebrachter DNA in eine Zelle (Singal und Ginder, 1999; Robertson und Wolffe, 2000).

3.2.2 DNA-Methylierung in der Tumorgenese

Die Tumorbildung und -progression entsteht aus einer kontinuierlichen Akkumulation genetischer und epigenetischer Veränderungen, die den Tumor der normalen zellulären und umweltbedingten Kontrolle entziehen. Diese Veränderungen schließen Gene der Zell-Zyklus-Kontrolle, Apoptose, Angiogenese, Adhäsion,

transmembranären Signalübertragung, DNA-Reparatur und der genomischen Stabilität ein (Gray und Collins, 2000).

Bei der Untersuchung von Tumorgenomen und -zelllinien zeigten sich verschiedene methylspezifische Veränderungen, die allein, aber vielmehr noch in ihrer Gesamtheit die Entstehung und das Wachstum einer Neoplasie entscheidend beeinflussen können. Am häufigsten wurden Hypermethylierungen im Promotorbereich von Tumorsuppressorgen gefunden, die funktionell einer Mutation und mit einem Funktionsverlust dieser „gatekeepers“ entsprechen (Singal und Ginder, 1999; Baylin et al., 2001; Frühwald und Plass, 2002).

In fast allen analysierten Tumoren konnten diese inaktivierten Kontrollgene gefunden werden, z.B. das *Rb*-Gen in Retinoblastomen, das *VHL*-Gen in Nierenzelltumoren, das *E-cadherin*-Gen in Mamma-, Schilddrüsen- und Magenkarzinomen und das *BRCA1*-Gen in Mamma- und Ovarialtumoren (Costello und Plass, 2001). Das Tumorsuppressorgen *p16^{INK4A}* (CDKN2A für Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2a) zählt neben *p53* zu den am häufigsten inaktivierten Genen in Tumoren. *p16* ist ein Kinase-Inhibitor, der im CyclinD-Rb-Zyklus bei der Aufrechterhaltung des aktiven, nicht-phosphorylierten Zustandes des Retinoblastom-Proteins (*Rb*) eine wichtige Rolle spielt. Die Kontrolle des Zellzyklus ist in zahlreichen Tumoren und Zelllinien verloren gegangen, entweder durch Inaktivierung des *p16*-Gens oder durch *Rb*-Genmutation. Die Inaktivierung des *p16*-Gens auf 9p21 geschieht durch Deletion, Punktmutation oder Promotorhypermethylierung (Singal und Ginder, 1999; Baylin und Herman, 2000).

Neben dieser Hypermethylierung wurden aber auch globale und lokale Demethylierungen nachgewiesen. Die genomweite Hypomethylierung der normalerweise stark methylierten repetitiven und heterochromatischen DNA-Sequenzen bewirkt eine Aktivierung dieser mobilen Elemente und eine chromosomale Instabilität in Tumorgenomen (Robertson und Wolffe, 2000; Costello und Plass, 2001). In geprägten Regionen kommt es zu einem Verlust von Prägungsmerkmalen (loss of imprinting, LOI; Esteller und Herman, 2002). Das Ausmaß der genomweiten Hypomethylierung, welche 20-60% vom Ausgangstumor betragen kann (Feinberg et al., 1988; Costello und Plass, 2001), ist Tumortyp spezifisch und eng mit dem Malignitätsgrad verbunden. So nimmt zum Beispiel in Mamma-, Ovarial- und Zervikalkarzinomen die Hypomethylierung des Tumorgenoms

mit Erhöhung des Malignitätsgrades zu (Costello und Plass, 2001). Auch in Zelllinien dieser Tumoren war der Verlust an Methylcytosin ähnlich (47 %, Singal und Ginder, 1999; Esteller et al., 2001). Aber auch Demethylierungen von spezifischen Onkogenen können stattfinden, welche daraufhin aktiviert werden. Das Antiapoptose-Gen *bcl-2* ist bei chronisch-lymphatischer Leukämie, das *k-ras*-Gen in Bronchial- und Kolontumoren (Singal und Ginder, 1999) sowie das *H-ras*-Gen und das *c-myc*-Gen in gastrointestinalen Tumoren hypomethyliert. Wie in diesen Bereichen die Methylgruppen verlorengehen, ist umstritten. Wahrscheinlich ist, daß die Methylierung entweder während des Zellzyklus nicht erhalten bleibt oder aktiv durch demethylierende Enzyme verändert wird (Frühwald und Plass, 2002).

Ein weiteres, häufig in Tumorgenomen zu findendes Phänomen ist eine erhöhte Mutationsrate von Cytosinen innerhalb von CpG-Inseln, wobei hier epigenetische und genetische Faktoren zusammenwirken. Methylcytosin wird dabei zu Uracil deaminiert. Daraus resultiert eine veränderte Gensequenz mit vorzeitigen Stopcodons. Bedeutend ist dabei auch, daß diese einmal eingetretene Modifikation an alle weiteren Generationen von Tumorzellen weitergegeben wird. Nur durch den Einsatz von 5-Azacytidin kann *in vitro* eine genomische Region demethyliert und der Funktionsverlust revidiert werden (Bender et al., 1997; Robertson und Jones, 2000).

3.2.3 DNA-Methylierung im Alter

Nachgewiesenermaßen steigt mit dem Alter der Methylierungsgrad in normalen kolorektalen Epithelzellen und wahrscheinlich auch in anderen Geweben. Die Ursache hierfür ist unbekannt. Eventuell beruht der Anstieg auf endogenen Faktoren in der DNA-Struktur, zum Beispiel der Transkriptionsaktivität oder der Karzinogen-Exposition. Auch eine altersabhängige globale Hypomethylierung wurde in verschiedenen Zellen beschrieben. Wenn bei diesen Prozessen Gene beeinflusst werden, die das Wachstum und die Differenzierung dieser Zellen regulieren, könnte dies zu einer Prädisposition für die Entwicklung von Tumoren führen (Toyota und Issa, 1999). Bevor DNA-Methylierung zur frühen Tumordetektion eingesetzt werden kann, ist es notwendig zu wissen, welche DNA-Methylierungsmuster in normal erscheinendem Gewebe mit Tumorentwicklung und welche mit dem Alter, aber nicht mit einer Tumoprädisposition, verbunden sind.

3.2.4 Der Mechanismus der Geninaktivierung

Um ein Gen auszuschalten, bedarf es neben der Methylierung auch zahlreiche andere Faktoren, zu denen Methylcytosin bindende Proteine und Histondeazetylasen zählen, wobei aber der Methylierung die größte Bedeutung zukommt.

„Methylierung blockiert die Transkription“ wäre jedoch eine zu starke Vereinfachung des zugrundeliegenden Prozesses. Vielmehr verändert die Methylierung die Interaktion zwischen Transkriptionsproteinen und der DNA, was zu Veränderungen in der Chromatinstruktur und damit entweder zu einem Anstieg oder einer Erniedrigung der Transkriptionsaktivität führt. Im Jahr 2000 fassten Baylin und Herman die bis dato gewonnenen Erkenntnisse in folgendem Modell zusammen. Die DNA ist ständig von aktivierenden und repressorischen Komplexen umgeben. Sind die CpG-Inseln in Promotoren unmethyliert, können aktivierende Transkriptionsfaktoren binden, welche die DNA in einen acetylierten und somit aktiven Zustand versetzen. Polymerasen können sich anlagern und die Transkription findet statt. Wurden die CpG-Inseln eines Promotors aber methyliert, werden diese Faktoren durch Methylcytosin-bindende Proteine (MeCP 1/2) verdrängt, welche in Verbindung zu Repressorkomplexen stehen. Die in diesen Komplexen enthaltenen Histondeacetylasen (HDAC) initiieren einen Umbau des Chromatins in einen deacetylierten und damit inaktiven Zustand, der eine Bindung von DNA-Polymerasen blockiert (Baylin und Herman, 2000). Diese Umwandlung ist so wirkungsvoll, daß selbst ein starker Transkriptionsförderer die Wirkung von Chromatin, das durch DNA-Methylierung in inaktiven Zustand gebracht wurde, nicht aufheben kann (Toyota und Issa, 1999).

Am Prozess der Tumormethylierung sind auch die DNA-Methyltransferasen (DNMTasen) beteiligt, die durch die Methylierung nach der DNA-Synthese das Methylierungsmuster auf die Tochterzellen übertragen und so aufrechterhalten (siehe 3.2.1). In vielen Tumorgenomen, aber auch in spezifischen Zellen nach Karzinogen-Exposition läßt sich eine gesteigerte DNMTase-Aktivität und damit eine Erhöhung der Methylierung nachweisen (Belinsky et al., 1996; Robertson und Jones, 2000). DNMTasen wirken als *downstream effector* von Onkogenfunktionen: das Proto-onkogen *fos* induziert die Methyltransferase DNMT1, um so den transformierten Zellphänotyp zu erhalten, der durch *fos* induziert wurde (Toyota und Issa, 1999).

Neben der Demethylierung mit 5-Azacytidin *in vitro* bieten die DNMTasen einen weiteren Ansatz zur Methylierungsblockade. In gentechnischen Experimenten konnte durch eine Verringerung der DNMTase-Aktivität die Tumorprogression verlangsamt werden (Laird et al., 1995).

3.2.5 Genetische Erkrankungen aufgrund von Methylierungsstörungen

Die Änderung des Methylierungsstatus in Genomen ist aber nicht nur ein entscheidender Faktor in der Tumorgenese, sondern auch in der Entstehung zahlreicher kongenitaler Erkrankungen.

Das **ICF-Syndrom** (immunodeficiency, centromere instability, facial anomalies) ist eine seltene autosomal-rezessive Erkrankung mit einem typischen Symptomenkomplex aus Immunschwäche, chromosomaler Instabilität und Gesichtsfehlbildungen. Ein charakteristisches Merkmal ist die Verlängerung und Hypomethylierung des zentromernahen Heterochromatins auf den Chromosomen 1, 9 und 16. Diese Bereiche bestehen aus zahlreichen Satelliten-DNA-Sequenzen, die normalerweise in somatischen Zellen stark methyliert sind (Maraschio et al., 1988; Jeanpierre et al., 1993). Ebenso sind andere repetitive Elemente im Genom und Einzelkopie-Sequenzen auf dem inaktiven X-Chromosom demethyliert. Als Ursache für diese Veränderungen konnten Mutationen in einer DNA-Methyltransferase (*DNMT3B*-Gen in 20q11.2) gefunden werden (Hansen et al., 1999; Okano et al., 1999; Xu et al., 1999)

Das **Rett-Syndrom**, eine X-chromosomale Erkrankung, ist eine der häufigsten Ursachen für sporadische mentale Retardierung bei Frauen. Nach einer zunächst normalen Entwicklung kommt es zu einem progressivem Verlust der Sprache und der erworbenen motorischen Fähigkeiten (Hagberg et al., 1983). Eine Mutation im *MeCP2*-Gen (Xq28) führt dabei zu einer inkorrekten Interpretation des Methylierungssignals (Amir et al., 1999).

Für das **Fragile-X-Syndrom** konnte eine Mutation in der chromosomalen Region Xq27.3 (*FMR1*-Gen) verantwortlich gemacht werden. Diese Erkrankung ist die häufigste Form von angeborener mentaler Retardierung nach dem Down-Syndrom und tritt vor allem bei Jungen auf.

Zu den genetischen Erkrankungen, deren Ursache eine Störung der genomischen Prägung (genomisches Imprinting) ist, gehören das **Prader-Willi-Syndrom (PWS)** und das **Angelman-Syndrom (AS)**. Die chromosomale Region 15q12 enthält zwei aneinandergrenzende DNA-Sequenzen mit gegensätzlicher Prägung. Das aktive väterliche PWS-Allel liegt dem durch Prägung inaktivierten mütterlichen Allel und das aktive mütterliche AS-Allel liegt dem inaktivierten väterlichen Allel gegenüber. Geht durch Deletion die Expression des väterlichen PWS-Allels verloren, entwickelt sich ein Prader-Willi-Syndrom, welches durch geistige Retardierung, Adipositas, Hypogonadismus und muskuläre Hypotonie der Kinder gekennzeichnet ist. Fehlt hingegen das mütterliche AS-Allel, entsteht das Angelman-Syndrom (geistige Retardierung, Wachstumsverzögerung und Hyperaktivität und Lachanfalle; Strachan und Read, 1996d). Beide Syndrome können aber auch durch uniparenterale Disomie entstehen. Dabei stammen beide Allele eines Gens von demselben Elternteil ab. Beispiele für Erkrankungen mit dieser Ursache sind die akute myeloische Leukämie (paternales Chromosom 7), das Neuroblastom (maternale Region 1p36 + paternales Chromosom 2), das Rhabdomyosarkom und der Wilms-Tumor (maternale Region 11p15.5; Frühwald und Plass, 2002).

Die **Blasenmole** entsteht durch die Entartung der Plazenta im Sinne einer Fehlbildung der Chorionzotten. Zytogenetische Untersuchungen zeigen, daß alle 46 Chromosomen vom Vater stammen und alle Loci homozygot sind. Ursache ist vermutlich die Degeneration des weiblichen Pronukleus des befruchteten Eis und die Verdoppelung der väterlichen DNA, um die Diploidie sicherzustellen. Die meist gutartigen **Ovarialteratome** besitzen dagegen einen doppelten mütterlichen Chromosomensatz (46, XX). Sie bestehen aus mehr oder weniger differenziertem Embryonalgewebe (Strachan und Read, 1996e).

3.3 Chronisch-Myeloische Leukämie

Die chronisch-myeloische Leukämie (CML) entsteht durch die maligne Transformation einer hämatopoetischen Stammzelle. Durch die langsam einsetzende klonale Proliferation kommt es zu einer Vermehrung von Granulozyten und deren Vorstufen im peripheren Blut und progredienter Verdrängung des normalen

Knochenmarkes. In den meisten Fällen von CML wird ein charakteristisches genetisches Merkmal nachgewiesen. Das Philadelphia-Chromosom, welches erstmals von Nowell und Hungerford 1960 beschrieben wurde, entsteht durch einen Austausch von chromosomalen Sequenzen zwischen Chromosom 9 und 22 (balancierte reziproke Translokation $t(9;22)(q34;q11)$, Rowley 1973). Dabei wird das Onkogen *bcr-abl* (*bcr-break cluster region*, *abl* - Homolog des Abelson-Leukämie-Virus) gebildet, eine Tyrosinkinase mit veränderter Aktivität, welche die Signaltransduktionswege und die Genexpression beeinflusst. Das *ABL*-Gen besitzt zwei Promotoren (*Pa* und *Pb*), von denen der *Pa*-Promotor im fusionierten *BCR-ABL* vorhanden ist. Es konnte nachgewiesen werden, daß dieser *Pa-ABL*-Promotor bei CML methyliert ist (Zion et al., 1994) und das Tumorsuppressorgen *p15* mit der Progression der Erkrankung hypermethyliert werden kann (Nguyen et al., 2000).

Die Erkrankung verläuft in drei Stadien: die chronische Phase ist gekennzeichnet durch die ausgeprägte Granulozytose bei noch kompensierter Thrombozytopoese und Erythrozytopoese. In der akzelerierten Phase entstehen zusätzliche chromosomale Veränderungen, am häufigsten eine Trisomie 8, Trisomie 19 oder ein zusätzliches Philadelphia-Chromosom (Su et al., 1999, Gribble et al., 1999). Mittels Comparative Genomic Hybridization (CGH) konnten außerdem genomische Zugewinne oder Verluste in zahlreichen Regionen beschrieben werden. Der Bereich 1p12-21 war auffallend oft in Translokationen involviert (Su et al., 1999, Gribble et al., 1999). In der finalen Blastenkrise werden massenhaft unreife Vorläuferzellen ins Blut ausgeschwemmt. Der Phänotyp der Blasten ist meist myeloisch, seltener lymphatisch. Die klinischen Symptome reichen von Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Nachtschweiß in den ersten beiden Stadien bis hin zu Fieber, Blutungen und Infektionsneigung aufgrund der gestörten Hämatopoese in der Blastenkrise. Die molekulargenetischen Untersuchungen im Stadium der Blastenkrise zeigten bei 20-30% der Patienten eine Deletion eines der beiden Allele des *p53*-Gens (Su et al., 1999), eine Hypermethylierung des Calcitonin-Genes auf 11p15 (Mills et al., 1996) und eine homozygote Deletion von *p16* auf 9p21 in 50% der Patienten in lymphoider Blastenkrise (Sill et al., 1995). Genomweite epigenetische Phänomene wie Hyper- oder Demethylierungen in langen Sequenzen wurden bis jetzt noch nicht beschrieben. Durch eine Knochenmarktransplantation kann eine Heilungsrate von 60% erreicht werden (Herrmann und Drings, 1998).

3.4 Molekulargenetische Methoden

3.4.1 Natriumbisulfitreaktion und methylspezifische Polymerasekettenreaktion

Zunächst werden alle in einer DNA-Sequenz vorhandenen unmethylierten Cytosine mittels Natriumbisulfit zu Uracil konvertiert. Für diese Umsetzung wird das Protokoll von Clark und Mitarbeiter von 1994 verwendet. Die Natriumbisulfitreaktion besteht aus folgenden Einzelreaktionen: (1) die Addition von Bisulfitionen an die 5-6 Doppelbindung von Cytosin (Cytosin-SO₃, Sulfonisierung), (2) die hydrolytische Deaminierung des entstandenen Bisulfit-Cytosin-Derivates zu einem Uracil-Bisulfit-Derivat (Uracil-SO₃) und (3) die Abspaltung der Sulfonylgruppe bei alkalischen Reaktionsbedingungen unter Bildung von Uracil. Voraussetzung ist die Denaturierung der untersuchten DNA in Einzelstrang-DNA. Auch methylierte Cytosine reagieren mit Natriumbisulfit, jedoch ist diese Reaktion extrem langsam und das Reaktionsgleichgewicht liegt weit auf Seiten des Ausgangsproduktes, so daß diese Umwandlung praktisch nicht erfolgt (Clark et al., 1994). Anschließend wurde mit einem Teil der DNA-Probe in der methylspezifischen Polymerasekettenreaktion (MSP, Herman et al., 1996) die Amplifikation mit spezifischen Primern für methylierte und unmethylierte DNA durchgeführt. In Abb. 1 sind die einzelnen Schritte der Natriumbisulfitreaktion und der anschließenden MSP an einer Beispielsequenz dargestellt.

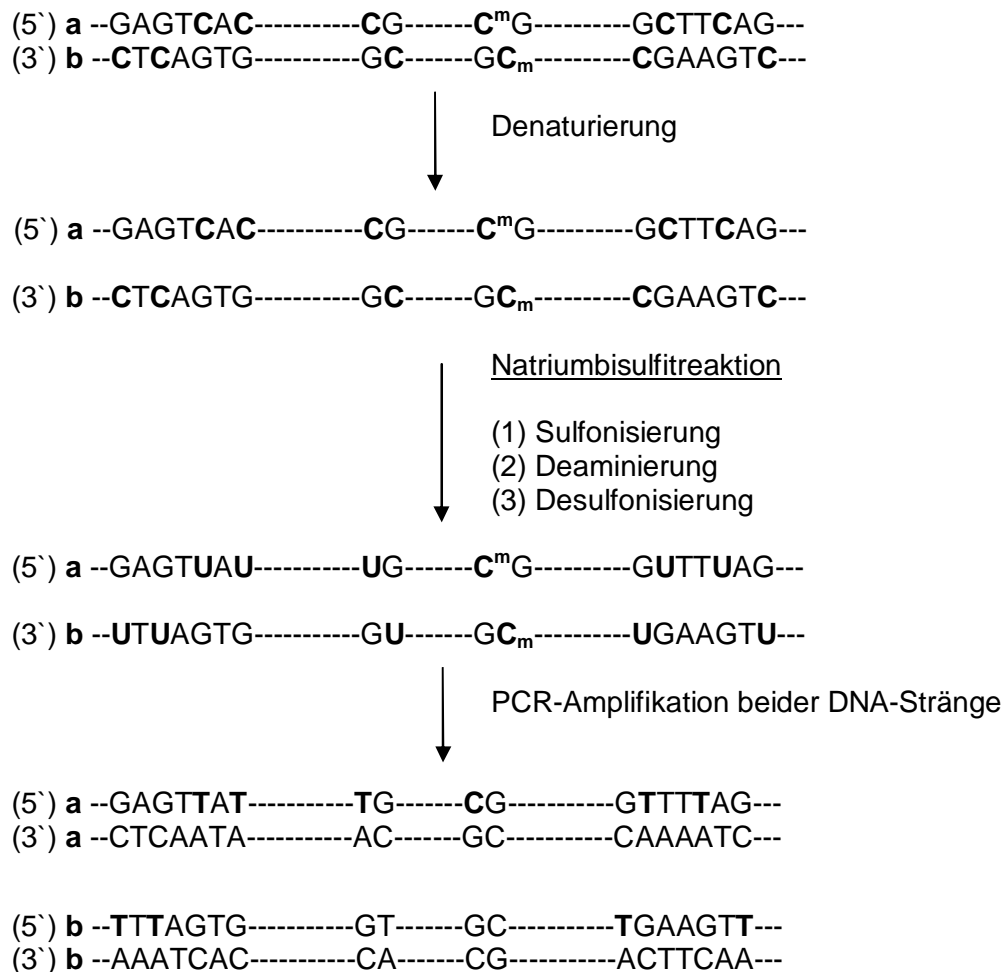


Abb. 1 Protokoll der Natriumbisulfitreaktion und der anschließenden methylspezifischen Polymerasekettenreaktion (MSP, Herman et al., 1996) an einer Beispielsequenz. Die beiden komplementären originalen DNA-Stränge wurden mit **a** und **b** gekennzeichnet. Cytosine und die entsprechenden Umwandlungsprodukte Uracil und Thymidin sind fett dargestellt. C^m bezeichnet ein methyliertes Cytosin. Nach der Natriumbisulfitreaktion sind die beiden DNA-Stränge **a** und **b** nicht mehr komplementär und werden getrennt amplifiziert (Clark et al., 1994).

Mit der MSP kann einerseits eine Aussage über den Methylierungsstatus der Beispielsequenz, hier des Tumorsuppressorgens *p16*, als auch über die Vollständigkeit der Konversion getroffen werden. Die *p16*-Primer wurden von Herman und Mitarbeiter als optimal für diese Kontrolle beschrieben, da in den untersuchten Zelllinien und Normal-Geweben keine Methylierung in der CpG-Insel von *p16* gefunden werden konnte. In Tumorzelllinien waren jedoch umfassende Methylierungen nachweisbar (Herman et al., 1996). Die *p16*-Primer wurden so gewählt, daß eine Unterscheidung zwischen methylierter und unmethylierter

Sequenz einerseits (durch CpG-Paare nahe dem 3'-Ende des Primers) sowie zwischen vollständig konvertierter und nicht konvertierter DNA andererseits (durch eine hohe Zahl an Cytosinen) möglich wurde. In Tabelle 1 (S. 27) sind die bei der MSP verwendeten *p16*-Primerpaare dargestellt. Enthielt die *p16*-Sequenz der isolierten genomischen DNA unmethylierte Cytosine, so erfolgte im optimalen Fall durch die Natriumbisulfitreaktion eine chemische Umwandlung in Uracil, während alle anderen Basen unverändert blieben. Durch die MSP wurde diese Sequenz durch das Primerpaar *p16u* mit einer Fragmentlänge des PCR-Produktes von 151 bp amplifiziert. Waren an die Cytosine der *p16*-Sequenz jedoch Methylgruppen gekoppelt, wurden diese Basen nicht verändert und die Amplifikation erfolgte durch das *p16m*-Primerpaar. Das *p16w*-Primerpaar konnte nur Sequenzen amplifizieren, die nicht durch die Natriumbisulfitreaktion verändert waren, also entweder bei erfolgloser Umsetzung oder bei der als Kontrolle eingesetzten nativen DNA-Probe. Die Vorteile dieser nicht-radioaktiven Methode sind geringe Kosten und geringer Aufwand bei großer Sensitivität und Spezifität der Natriumbisulfitreaktion sowie die Kombination mit der PCR, einem in der Molekulargenetik standardisierten Verfahren. Es werden sowohl methylierte als auch unmethylierte Bereiche wie auch Sequenzen ohne stattgefundene Umwandlung eindeutig anhand der Bandenlänge des PCR-Produktes nach der MSP erkannt.

3.5 Molekularzytogenetische Methoden

3.5.1 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Zu den Standardverfahren der molekularen Zytogenetik gehört die auch in dieser Arbeit angewandte Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH). Durch eine Vielzahl von Optimierungen und Weiterentwicklungen seit der Erstbeschreibung von Pinkel und Mitarbeiter ist sie heute eine sehr effiziente Methode zum Nachweis von DNA-Sonden auf Metaphasechromosomen geworden (Pinkel et al., 1986).

Für die FISH nutzt man die Eigenschaft der DNA, zu Doppelsträngen zu hybridisieren. Man denaturiert dazu sowohl die Sonden-DNA als auch die chromosomale Ziel-DNA auf dem Objektträger und wählt anschließend die Bedingungen so, daß möglichst nur komplementäre Stränge ein Hybrid bilden. Die

Markierung der Sonden-DNA geschieht durch den Einbau von Nukleotiden, die ein Reportermolekül tragen. Nach der Hybridisierung erfolgt die Inkubation mit Fluorochrom tragenden Liganden oder Antikörpern, die an die Reportermoleküle binden und eine genaue Lokalisation der Sonden-DNA ermöglichen. Eine Absättigung der repetitiven DNA-Elemente ist durch Hybridisierung mit einer großen Menge an unmarkierter gesamtgenomischer DNA (Cot1-DNA) möglich.

3.5.2 Comparative Genomic Hybridisation

Die Comparative Genomic Hybridization (CGH, vergleichende Genomhybridisierung) wurde erstmals von Kallioniemi und Mitarbeiter beschrieben und basiert auf der kompetitiven *in situ* Hybridisierung von unterschiedlich markierter gesamtgenomischer Tumor-DNA (Test-DNA) und normaler Referenz-DNA auf normale Metaphasechromosomen (Kallioniemi et al., 1992). Nach der Hybridisierung und Detektion der gebundenen DNA erfolgte die Aufnahme der Metaphase mit dem Fluoreszenzmikroskop. Mittels einer Software wurde das Verhältnis zwischen den Fluoreszenzintensitäten der Tumor-DNA und der Referenz-DNA errechnet und entlang der einzelnen Chromosomen graphisch dargestellt. Die Referenz-DNA stellt dabei einen internen Standard dar, anhand dessen chromosomale Aberrationen der Tumor-DNA erkannt werden können. In der vorliegenden Arbeit werden die Bindungsaffinitäten der Test-DNA und der Referenz-DNA, die sich vor und nach Behandlung mit Natriumbisulfit unterscheiden, mit dieser Methode verglichen. Die absoluten Signalintensitäten sind abhängig von der Qualität der Metaphase, der Effektivität von DNA-Markierung und Hybridisierung, der Empfindlichkeit der Kamera und der Belichtungszeit (Piper et al., 1995).

Zunächst wird die mit Natriumbisulfit behandelte gesamtgenomische Normal-DNA (Test-DNA) und unbehandelte gesamtgenomische Normal-DNA (Referenz-DNA) miteinander verglichen. Durch die Konversion von unmethylierten Cytosinen in Uracil durch die Natriumbisulfitreaktion entstehen Basensequenzänderungen, welche die Bindungsaffinität der entsprechenden chromosomalen Regionen in der Test-DNA zu den Ziel-Sequenzen auf den Metaphaseplatten vermindern. Da methylierte Cytosine in der Natriumbisulfitreaktion nicht umgewandelt werden, zeigen methylierte Regionen eine Mischfarbe entsprechend der identischen Bindungsstärke.

Anschließend erfolgt die vergleichende Hybridisierung zwischen gesamt-genomischer CML-DNA (Test-DNA) und Normal-DNA (Referenz-DNA), welche beide zuvor mit Natriumbisulfit behandelt wurden. Wenn in einer der beiden die DNA-Proben der Methylierungsgehalt in bestimmten chromosomalen Bereichen höher ist als in der anderen Probe, würde dies durch die höhere Bindungsstärke der methylreicheren DNA-Probe angezeigt werden. Um die beiden Genome exakt miteinander vergleichen zu können, werden Test- und Referenz-DNA mit der gleichen Methode markiert und eventuell amplifiziert.

3.5.3 Methoden zur Markierung von DNA-Proben für FISH und CGH

Die am häufigsten angewandten nicht radioaktiven Verfahren sind die direkte und indirekte Fluoreszenz-Markierung. Bei der direkten Methode werden Fluorochrom-tragende Nukleotide in die Sonden-DNA eingebaut, welche nach der Hybridisierung ohne Zwischenschritt unter dem Mikroskop sichtbar werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die indirekte Markierung benutzt. Dabei werden Nukleotide, an die ein Reportermolekül gekoppelt wurde, in die Sonden-DNA eingefügt. Nach der Hybridisierung wird mit Liganden-tragenden Fluorochromen detektiert, wobei die Liganden an ihre spezifischen Reportermoleküle binden. Angewandt wurde das in der Zytogenetik etablierte System Biotin-Digoxigenin. Die eingebauten Nukleotide tragen entweder das Reportermolekül Biotin, welches mit Streptavidin-FITC (grün) nachgewiesen wird oder das Reportermolekül Digoxigenin, das mit Anti-Digoxigenin Rhodamin (rot) detektiert wird. Beide Fluorochrome besitzen unterschiedliche Emissionswellenlängen (FITC: 525 nm, Rhodamin: 605 nm) und können so getrennt voneinander aufgenommen werden. Ein Vorteil des indirekten Verfahrens ist die höherer Sensitivität, denn es besteht die Möglichkeit der Signalverstärkung durch die erneute Zugabe eines Reportermoleküls sowie des Liganden-tragenden Fluorochroms. Außerdem sind die DNA-Proben weniger lichtempfindlich und das System kostengünstiger.

Zur Markierung der Sonden-DNA wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Die Polymerasekettenreaktion mit degenerierten Oligonukleotid-Primern (DOP-PCR) ermöglicht die Amplifikation von DNA-Abschnitten ohne bekannte Sequenz (Telenius et al., 1992). Dazu werden universelle Primer verwendet, die aus 22 Nukleotiden

bestehen. In der Mitte befinden sich 6 Nukleotide, die zufällig gewählt werden (=N), so daß man folgende Primersequenz erhält: 5'- CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G -3'. Um eine möglichst unspezifische Amplifikation zu erhalten, wählt man eine relativ niedrige Anlagerungstemperatur (25°C) und eine Polymerase, die bei niedriger Temperatur arbeitet (Sequenase).

Bei der Nick-Translation setzt eine DNase Einzelstrangbrüche (nicks) in den DNA-Strang. Eine DNA-Polymerase hängt am 3'- Ende neue Nukleotide an, von denen eines oder mehrere unterschiedliche Reportermoleküle tragen, die in einer nachfolgenden Detektionsreaktion nachgewiesen werden können. Gleichzeitig baut eine 5' → 3'- Exonuklease am 5'-Ende die alten Nukleotide ab. Die Bruchstelle wird so in 5' → 3'- Richtung entlanggeschoben („transloziert“). Bei einer geringen Reaktionstemperatur von 15°C schreitet die Reaktion nur soweit fort, bis der alte Nukleotidstrang ersetzt ist. Es erfolgt keine Neusynthese von DNA-Strängen.

3.6 Überlegungen zum Versuchsaufbau

In der vorliegenden Arbeit werden zwei in der Humangenetik standardisierte Verfahren, die Natriumbisulfitreaktion und die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung, kombiniert. Es wird gesamtgenomische DNA aus Lymphozytenkulturen gesunder Probanden und von Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie sowie gesamtgenomische DNA aus Zelllinien von kolorektalen Karzinomen verwendet. Die Natriumbisulfitumsetzung der isolierten DNA wird zunächst nach dem Protokoll von Clark und Mitarbeiter begonnen und in Anlehnung an die Arbeit von Grunau und Mitarbeiter durch die Änderung der Reaktionsparametern nach einem für die vorliegende Arbeit optimalen Verfahren gesucht (Clark et al., 1994; Gruau et al., 2001). Sie untersuchten systematisch den Einfluß von Reaktionszeit und Temperatur auf die Natriumbisulfitreaktion und fanden eine Dauer von 4-18 Stunden bei 55°C oder alternativ eine Stunde bei 95°C als optimal. Diese Parameter sollten getestet und die Auswirkungen anhand der Messung der DNA-Konzentration nach der Umsetzung sowie anhand der Ergebnissen der methylspezifischen Polymerasekettenreaktion beurteilt werden. Anschließend erfolgte mit den Natriumbisulfit behandelten DNA-Proben die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) auf

Metaphasechromosomen einer Normalsuspension. Da die Auswertung durch subjektiven Vergleich der Fluoreszenzintensitäten auf verschiedenen Chromosomen erfolgt, sollte versucht werden, die Ergebnisse mit Comparative Genomic Hybridisation (CGH) zu objektivieren. Die Vorbereitungen für beide Verfahren sind ähnlich. Zur Markierung der Sonden-DNA vor den zytogenetischen Experimenten sind die PCR mit degenerierten Oligonukleotidprimern (DOP-PCR) und die Nick-Translation vorgesehen. Der Vorteil der Nick-Translation ist die schnelle Markierung ohne großen zeitlichen und apparativen Aufwand. Die Ausgangssequenz bleibt dabei unverändert. Die DOP-PCR hingegen ermöglicht eine Amplifikation und Markierung geringer DNA-Konzentrationen, ist jedoch ein sehr zeitintensives Verfahren. Um eine optimale Methode zu finden, werden beide angewandt und die Ergebnisse verglichen. Weiterhin sind Versuche mit kompetitiver Hybridisierung vorgesehen. Dabei wird ein möglicherweise starkes Fluoreszenzsignal in repetitiven DNA-Bereichen durch Verwendung von Cot1-DNA unterdrückt. Dies ist eine Fraktion genomischer DNA, in der hochrepetitive Sequenzen (*Alu*-, *Kpu*-Elemente) angereichert sind. Die unmarkierte Cot1-DNA wird zusammen mit der markierten Sonden-DNA hybridisiert und bewirkt durch den Überschuss an unmarkierten repetitiven Bereichen eine Blockade der markierten repetitiven Bereiche in der Sonden-DNA. So wird deren Anlagerung an die entsprechenden Zielsequenzen auf den Metaphasen verhindert. Die Geschwindigkeit, mit der ein Einzelstrang eine komplementäre Sequenz findet und mit ihr hybridisiert, wird durch eine Reassoziationskinetik beschrieben. Sie wird hauptsächlich von zwei Parametern bestimmt: der Ausgangskonzentration (C_0) einer bestimmten DNA-Sequenz in Mol Nukleotiden pro Liter und der Reaktionszeit (t) in Sekunden. Die Reassoziationsgeschwindigkeit ist proportional zu C_0 und t und wird daher durch den Cot-Wert dargestellt. Sie ist langsam bei Einzelstrangkopien (c niedrig) und schnell bei repetitiven Sequenzen, die dann auch ein starkes Hybridisierungssignal zeigen und schwache Signale der Einzelstrangkopien unterdrücken. Cot1-DNA hat einen Cot-Wert von 1, d.h. bei einer Ausgangskonzentration von 3 μ mol Nukleotiden pro Liter und einer Renaturierungszeit von 330 Sekunden ergibt sich eine Reassoziationsgeschwindigkeit von 1 mol Nukleotiden pro Sekunde und Liter (Kallioniemi et al., 1992; Strachan und Read, 1996a). Um aber auch die repetitiven Bereiche hinsichtlich ihrer Methylierung untersuchen zu können, sollte teilweise mit

weniger bzw. ohne Cot1-DNA gearbeitet werden. Auch die Temperaturen und der Salzgehalt der Lösungen für die Posthybridisierungs-waschungen sowie die Waschzeit sollten variiert werden, denn diese Parameter haben entscheidenden Einfluß auf die Spezifität und Sensitivität des Ergebnisses. Meist wählt man diese Bedingungen so, daß bevorzugt Heteroduplices entstehen. Dies sind Strangpaarungen zweier Sequenzen unterschiedlicher Herkunft (Ziel- und Sonden-DNA), die dann thermodynamisch am stabilsten sind, wenn alle Basen im Doppelstrangbereich perfekt gepaart sind. Durch die Erniedrigung der Salzkonzentration und eine Temperaturerhöhung wird die Stringenz erhöht, d.h. die Trennung fehlgepaarter Sequenzen gefördert. Die Stringenz der Waschlösung hängt v.a. von der Nähe der Waschttemperatur zur Schmelztemperatur der Sonden-DNA, von der Ionenstärke und der Formamidkonzentration in der Waschlösung ab. Bei Säugergenomen mit einer Basenzusammensetzung von ca. 40 % GC denaturiert die DNA bei etwa 87°C. Fehlpaarungen verringern die Schmelztemperatur und das Waschen bei hohen Temperaturen trennt diese Paarungen wieder (Strachan und Read, 1996c).

Weiterhin sollte die Natriumbisulfitreaktion direkt auf den Metaphasechromosomen der zu untersuchenden DNA-Proben erfolgen. Die in Uracile umgewandelten unmethylierten Cytosine unterscheiden sich in der anschließenden FISH von den methylierten, unveränderten Sequenzen. Es soll neben unbehandelter markierter gesamtgenomischer DNA eines unauffälligen Probanden auch mit einer Standardsonde (wcp #1, whole chromosome painting) mit chromosomalen Material des Chromsoms 1 hybridisiert werden, um die chromosomale Struktur nach der Natriumbisulfitreaktion beurteilen zu können. Dieses Verfahren würde durch den direkten Nachweis methylierter chromosomaler Strukturen auf Metaphasechromosomen das Verfahren wesentlich verkürzen.

4 Zielstellung

In den letzten Jahren spielte die DNA-Methylierung eine immer größere Rolle in Untersuchungen zur Entstehung von Tumorerkrankungen. Es wurden neben einer Zunahme der Zahl methylierter Cytosine in Promotoren regulatorischer Gene, z.B. Tumorsuppressorgene (Jones and Laird, 1999), auch Verluste im gesamten Tumorgenom nachgewiesen (Lengauer et al., 1997; Chen et al., 1998).

Die Methylierung in einzelnen DNA-Bereichen kann mit methylspezifischer Polymerasekettenreaktion (MSP, Herman et al., 1996) oder mit DNA-Sequenzierung nach Natriumbisulfitreaktion (Clark et al., 1994) beurteilt werden. Für genomweite Untersuchungen stehen bisher keine einfach durchzuführenden Methoden zur Verfügung, die gleichzeitig eine chromosomale Lokalisation der entsprechenden Regionen ermöglichen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist:

1. Die Beschreibung eines Verfahrens, welches eine Aussage über die genomweite Methylierung und die chromosomale Lokalisation methylierter Regionen ermöglicht sowie numerische und strukturelle chromosomale Veränderungen erkennen läßt. Es sollte reproduktiv, objektiv, zeit- und kostensparend sein.
2. Der Vergleich von DNA-Proben gesunder Probanden und von Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie sowie
3. die Untersuchung gesamtgenomischer DNA von Tumorzelllinien anhand dieser Methode.
4. Die Etablierung der direkten Natriumbisulfitreaktion auf Metaphasechromosomen.

Der Nachweis von DNA-Methylierungen könnte eine sehr vielversprechende Strategie zur Entdeckung und Charakterisierung eines Tumors sein, denn sie sind stabil, amplifizierbar und werden schon in einem frühen Stadium der Tumorgenese häufig beobachtet (Baylin et al., 2001). Inzwischen ist auch der Nachweis aberranter Methylierungsmuster in Proben aus Lymphknoten, Sputum und Serum gelungen (Esteller und Herman, 2002).

5 Material und Methoden

5.1 Molekulargenetische Methoden

5.1.1 Probenmaterialien

Als Ausgangsmaterial für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente diente gesamtgenomische DNA aus kultivierten Lymphozyten gesunder Probanden und von Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie. Die Lymphozyten der Patienten wurden am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena im Rahmen der molekularzytogenetischen Diagnostik kultiviert und befundet. Weiterhin wurde gesamtgenomische DNA einer Tumorzelllinie (Colo 320) verwendet, welche 1977 aus Zellen eines Adenocarcinoms des Sigmas gewonnen wurde. Aufgrund der synthetisierten Zellprodukte (Katecholamine, Serotonin, ACTH und PTH) war jedoch ein neuroendokriner Ursprung der Tumorzellen wahrscheinlicher als die Abstammung vom Adenoepithel des Kolons. Auffallend bei den zytogenetischen Untersuchungen waren die variable Anzahl der Chromosomen zwischen 38 und mehr als 100 sowie zahlreiche Markerchromosomen, die durch strukturelle Rearrangements von normalen Chromosomen entstanden sind. Weiterhin wurden in den Subkulturen entweder Double Minutes (DM) oder Homogeneously Stained Regions (HSR) gefunden (Quinn et al., 1979). Diese chromosomalen Strukturen, die zytologisch mittels Giemsa-Bänderung nachgewiesen werden können, enthalten oft multiple Duplikationen von DNA-Sequenzen. Wenn sie in malignen Tumoren gefunden werden, zeigen sie häufig eine Co-Amplifikation von Onkogenen. In Zellkulturen von Colo 320 konnten Amplifikationen und eine erhöhte Expression des zellulären Onkogens *c-myc* nachgewiesen werden. Da große HSR auf einem X-Chromosom-ähnlichen Chromosom liegen, ist eine Transposition des *c-myc*-Gens von seiner ursprünglichen Position in 8q24 zum X-Chromosom und eine anschließende Amplifikation wahrscheinlich (Alitalo et al., 1983; Erisman et al., 1988).

5.1.2 Lymphozytenkultur und DNA-Isolation

Für die Kultivierung der Lymphozyten wurden 10 ml des frisch angesetzten Nährmediums (RPMI 1640-Medium), 0,1 ml Phytohemagglutinin und 1 ml heparinisiertes Vollblut in sterile Gewebekulturflaschen (50 ml Volumen) gefüllt und

der Kulturansatz für 72 Stunden bei 37°C und einem CO₂-Partialdruck von 5% im geschlossenen System inkubiert. Phytohaemagglutinin ist ein Glykoprotein, das die T-Zell-Fraktion der Lymphozyten durch Bindung an die Zellmembran stimuliert, während die B-Zell-Fraktion und andere kernhaltige Zellen unbeeinflusst bleiben (Verma, Babu 1998).

Die gesamtgenomische DNA wurde anschließend mittels des Qiagen DNA Blood Mini Kit entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Nicht sofort benötigte DNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

5.1.3 Natriumbisulfitreaktion

Basierend auf dem Reaktionsprotokoll von Clark und Mitarbeiter von 1994 erfolgte der Ansatz der Natriumbisulfitreaktion nach folgendem Schema. Die isolierte gesamtgenomische DNA (1 - 4 µg in einem Volumen von 100 µl) wurde zunächst mit 3 M NaOH (Endkonzentration 0,3 M NaOH) 20 min bei 37°C denaturiert. Dieser Schritt ist notwendig, da nur einzelsträngige DNA mit Natriumbisulfit reagieren kann. Anschließend erfolgte die eigentliche Reaktion nach Zugabe von 10 mM Hydrochinon sowie 5 M Natriumbisulfit pH 5,0 (Endkonzentration 0,4 mM Hydrochinon und 3,5 M Natriumbisulfit als Lösung). Nach 16 Stunden bei 55°C unter Lichtabschluß wurden die Proben mittels eines CleanUp Kits entsprechend den Herstellerangaben gereinigt. Alternativ wurde die Reaktion bereits nach 4 Stunden gestoppt. Außerdem wurde die Reaktion eines Ansatzes bei 95°C für eine Stunde durchgeführt. Die Desulfonisierung als finalen Schritt der chemischen Konversion der DNA wurde durch eine erneute Zugabe von 3 M NaOH (frisch hergestellt, Endkonzentration 0,3 M NaOH) über 20 min bei 37°C erreicht. Um das Reaktionsprodukt zu neutralisieren, die umgesetzte DNA von den Reaktionspartnern zu reinigen und das Volumen der Probe zu verringern, erfolgte die Alkoholfällung unter Zugabe von 1 Volumenteil 6 M Ammoniumacetat (Endkonzentration 3 M Ammoniumacetat) sowie 2,5 Volumenteilen Ethanol (100%) und einer Lagerung für 1h bei -20°C. Nach Zugabe des monovalenten Salzes und des Alkohols fällt die DNA spontan aus. Bei den hier erzielten geringen Konzentrationen (< 250 ng/µl) läßt sich die Ausbeute jedoch durch die Aufenthaltszeit bei -20°C erhöhen. Die Probe wurde anschließend 15 min mit 11000 rpm bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand

abgenommen, das Pellet 2 min in der Speedvac getrocknet und in 15 µl aqua dest. aufgenommen. In der Speedvac führt ein angelegtes Vakuum zu einer Siedepunktserniedrigung des Alkohols und somit zu einem raschen Verdampfen der nach der Abnahme des Überstandes im Reaktionsgefäß verbliebenen Flüssigkeit. Die gleichzeitige Zentrifugation verhindert dabei ein Aufschäumen.

Nach Herstellung einer Verdünnung von 1:24 (16 µl aqua ad iniectionem, 4 µl der isolierten DNA-Probe) konnte die Konzentration der isolierten DNA mittels Absorptionsspektrometrie am Photometer nach folgender Gleichung bestimmt werden:

$$c [\mu\text{l/ml}] = OD_{260/280} \times V \times F$$

c = Konzentration der

$OD_{260/280}$ = optische Dichte bei 260 nm bzw. 280 nm Wellenlänge

V = Verdünnungsfaktor 24

F = Multiplikationsfaktor (50 für doppelsträngige DNA)

Die Proteinkontamination der DNA-Proben errechnet sich aus dem Verhältnis der bei 260 nm und 280 nm gemessenen optischen Dichten. Ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 entsprach hierbei einer weitgehend proteinfreien Lösung, während ein Verhältnis von über 2,0 für eine Verunreinigung mit RNA, von unter 1,8 für einen hohen Proteinanteil spricht.

5.1.4 Methylspezifische Polymerasekettenreaktion (MSP)

Wie bereits in Kapitel 3.4.1 beschrieben diente diese Reaktion der Kontrolle der Natriumbisulfitreaktion. Dazu wurde von jeder zuvor umgesetzten DNA-Probe drei Reaktionsansätze bestehend aus einer geringen Menge dieser DNA und jeweils einem Primerpaar (*p16u*, *p16m*, *p16w*; Tabelle 1) hergestellt. Das Paar *p16u* amplifiziert die Beispielsequenz des Tumorsuppressorgens p16 nur, wenn alle darin enthaltenen Cytosine unmethyliert sind. Eine Amplifikation mit *p16m* erfolgt bei methylierten Cytosinen. Hat keine Umsetzung stattgefunden, entspricht das PCR-Produkt dem Primerpaar *p16w*.

Tabelle 1 In der methylspezifischen Polymerasekettenreaktion (MSP) verwendete Primerpaare

<u>Primerpaar und Sequenz</u>	<u>Größe</u>
<u>p16w</u> 5'- CAG AGG GTG GGG CGG ACC GC - 3' 5'- CGG GCC GCG GCC GTG G -3' (Gegenstrang)	140 bp
<u>p16m</u> 5'- TTA TTA GAG GGT GGG <u>GCG</u> GAT <u>CGC</u> - 3' 5'- <u>GAC</u> CCC <u>GAA</u> CCG <u>CGA</u> CCG <u>TAA</u> - 3' (Gegenstrang)	150 bp
<u>p16u</u> 5'- TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT <u>IGT</u> - 3' 5'- <u>CAA</u> CCC <u>CAA</u> ACC <u>ACA</u> ACC ATA A - 3' (Gegenstrang)	151 bp

Das Primerpaar *p16w* entspricht der Originalsequenz (Wildtyp) des Tumorsuppressorgens *p16*. Die vom Paar *p16m* amplifizierte Sequenz beinhaltet methylierte Cytosine. Waren in der Ausgangssequenz unmethylierte Cytosine enthalten, wird diese durch das Primerpaar *p16u* amplifiziert. Anhand der Größe der amplifizierten Sequenzen ist eine Identifizierung in der Gelelektrophorese nach der MSP möglich ist. Die Sequenzunterschiede zwischen konvertierten methylierten und konvertierten unmethylierten sind unterstrichen dargestellt. An den fett hervorgehobenen Basen wurden die Primer modifiziert, um nicht konvertierte unmethylierte Cytosine zu erkennen (Herman et al., 1996).

Die PCR-Ansätze mit einem Reaktionsvolumen von 25 µl wurden unter einer Laminarbox in Kühlakkus nach folgendem Schema pipettiert (

Tabelle 2) und kurz gemischt. Es wurde stets eine Positivkontrolle und eine Leerprobe mitgeführt. Anhand der Längen der PCR-Produkte in der anschließenden Gelelektrophorese konnte eine Aussage über den Methylierungsstatus der DNA und die Vollständigkeit der Konversion getroffen werden.

Tabelle 2 Reaktionsansatz der methylspezifischen Polymerasekettenreaktion (MSP)

<u>Stammlösung</u>	<u>Endkonz.</u>	<u>pro DNA-Probe</u>
Natriumbisulfit umgesetzte DNA		10 - 50 ng
10x PCR Reaktionspuffer	1x	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	1,5 mM	1,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	1 U/µl	0,2 µl
10 mM dNTP-mix	0,48 mM dNTP-mix	1,2 µl
150 mM Betain	15 mM Betain	2,5 µl
10 µM Primer	0,4 µM Primer	1 µl
10 µM Primer (Gegenstrang)	0,4 µM Primer	1 µl
aqua ad iniectabilia		ad 25 µl

Von jeder mit Natriumbisulfit behandelten DNA-Probe wurden 3 Reaktionsansätze jeweils mit einem kleinen Teil der DNA sowie jeweils einem Primerpaar (*p16u*, *p16w*, *p16w*; Tabelle 1) und den übrigen aufgeführten Zusätzen hergestellt. Außerdem wurde stets eine Positivkontrolle und eine Leerprobe mitgeführt. Betain ist ein Reaktionsenhancer.

Tabelle 3 Reaktionsschritte der methylspezifischen Polymerasekettenreaktion (MSP)

	Temperatur	Zeitdauer	
1.	95°C	3:00 min	Denaturierung
2.	95°C	0:45 min	
3.	65°C	0:45 min	Primerannealing
4.	2,5°C /s bis 72°C		
5.	72°C	1:00 min	Elongation
6.	2. - 5. 32x (die Programmschritte 2-5 werden 32x wiederholt)		
7.	72°C	10:00 min	
8.	4°C	for ever	

Anschließend wurde die MSP in einem PCR-Cycler mit beheizbarem Deckel nach dem in Tabelle 3 beschriebenen Programm durchgeführt.

5.1.5 Gelelektrophorese

Um ein 3%iges Agarose-Gel zur Bestimmung der Fragmentlängen der PCR-Produkte herzustellen, wurde 1,05 g NuSieve Agarose in 35 ml 1x TBE-Puffer durch mehrmaliges Aufkochen gelöst. Diese Agarose ermöglicht eine bessere Darstellung von Banden im unteren Längenbereich von 20-1000 Basenpaaren.

Weiterhin wurde nach Abkühlen 7 µl Gelfarbstoff GelStar® Nucleic Acid Gel Stain (2000x) hinzugegeben und die Polymerisation des Gels unter Lichtabschluß ermöglicht. Die PCR-Produkte wurden mit 2-3 µl Ladepuffer versetzt, nach Mischen und Zentrifugieren auf das Agarose-Gel aufgetragen, die Gelkammer mit 1x TBE-Puffer gefüllt und 1 Stunde mit einer Spannung von 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte nach Anregung mit einem Transilluminator durch eine Kamera und einen Videoprinter. Durch den Vergleich mit dem Längenstandard V (64-587 bp) von Boehringer Mannheim konnten die Fragmentlängen der PCR-Produkte bestimmt werden.

5.1.6 Reagenzien und Geräte

Tabelle 4 Reagenzien für die Lymphozytenkultivierung und DNA-Isolation

Aqua ad iniectabila	Braun, D
Phytohämagglutinin-Lösung	lyophilisiertes Phytohämagglutinin (Seromed) in 5 ml aqua ad iniectabila (Braun, D) lösen, zu 1ml aliquotieren und bei -20°C lagern
QIAmp® DNA Blood Mini Kit	Qiagen, USA
RPMI 1640-Medium	500 ml RPMI 1640 mit Glutamax (Gibco BRL) + 60 ml fetales Kälberserum (12%, Biochrom KG, D) + 0,5 ml Penicillin (10000 U/ml, Biochrom KG, D)/ Streptomycin (10000 µg/ml, Biochrom KG, D)

Tabelle 5 Reagenzien für die Natriumbisulfitreaktion

6 M Ammoniumacetatlösung	2,31 g Ammoniumacetat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D) in 5 ml aqua ad iniectabila gelöst
Aqua ad iniectabila	Braun, D
Ethanol 100%	Merck, D
10 mM Hydroquinonlösung	2,2 mg Hydroquinon (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D) in 2 ml aqua ad iniectabila gelöst
3 M Natriumhydroxidlösung	0,6 g Natriumhydroxid (Merck, D) in 5 ml aqua ad iniectabila gelöst
5 M Natriumbisulfitlösung	0,94 g Sodium Metabisulfit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D) in 2 ml aqua ad iniectabila gelöst
Wizard® DNA Clean-Up System	Promega, USA

Tabelle 6 Reagenzien für die methylspezifische Polymerasekettenreaktion (MSP)

Agarose NuSieve 3:1	FMC BioProdukts, USA
Aqua ad iniectabila	Braun, D
150 mM Betain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D
10 mM GeneAmp® dNTP-mix	äquivalente Mengen 10 mM GeneAmp® dNTPs (Perkin Elmer®, USA)
2000x Gelfarbstoff GelStar® Nucleic Acid Gel Stain	2 µl 10000x Gelfarbstoff GelStar® Nucleic Acid Gel Stain (BioWhittaker Molecular Applications) + 8 µl 1xTE-Puffer
GoldStar® DNA Taq-Polymerase, 5 U/µl	Eurogentec, B

Längenstandard V	Boehringer Mannheim, D
Ladepuffer	95% Formamid + 20 mM EDTA + 0.05% Bromphenol-blau, 0.05% Xylencyanol
MgCl ₂ -Lösung	25 mM MgCl ₂ in 1,5 ml (Eurogentec, B)
p16- Primerpaare	MWG Biotech, D
10x Reaction Buffer	750 mM Tris-HCl (pH 8,8; 25°C) + 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ + 0,1 % (v/v) Tween 20 in 1,25 ml (Eurogentec, B)
10x TBE-Puffer	1.34 mM Tris-Base + 45 mM Borsäure + 25 mM EDTA, aqua ad iniectabilia
1x TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) + 1 mM EDTA (pH 8,0)

Tabelle 7 Geräte für die molekulargenetischen Methoden

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>
Gelelektrophoreseeinheit mit Stromversorgung	Serva Feinbiochemica GmbH & Co., D Elektrophoresis Power Supply ST305; GIBCO BRL
Peltier Thermal Cycler 200	MJ Research, USA
UVIKON Spektralphotometer 930	Kontron Instruments, UK
SpeedVac DNA 100	
Brutschrank Thermo Savant	Holbrook, USA
UV-Transilluminator mit Dokumentationseinheit	UV Emitter TFX53M DocuGel-V Mitsubishi Videoprinter Kamera

5.2 Molekularzytogenetische Methoden

Das Standard-Protokoll für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) umfaßt insgesamt 6 Arbeitsschritte, deren praktische Umsetzung im folgenden näher beschrieben werden.

1. Vorbereitung der Metaphasepräparate (5.2.1)
2. Markierung der genomischen DNA-Sonden (5.2.2)
3. Die eigentliche *in situ* Hybridisierung (5.2.3)
4. Posthybridisierungswaschungen (5.2.4)
5. Detektion, Gegenfärbung und Aufnahme (5.2.5)

Jeder dieser Schritte ist entscheidend für die Qualität und die Reproduzierbarkeit der FISH-Ergebnisse. Alle verwendeten Reagenzien und Geräte sind unter 5.4 aufgeführt.

5.2.1 Vorbereitung der Metaphasepräparate

In der vorliegenden Arbeit wurden Metaphasen von kultivierten Lymphozyten gesunder Probanden als Hybridisierungspartner für die gesamtgenomische Sonden-DNA verwendet. Die Lymphozytenkultivierung erfolgte wie in 5.1.2 beschrieben. Um eine Anreicherung von Mitosen im Stadium der Metaphase zu erreichen, wird zwei Stunden vor Ende der Kultivierungsdauer pro Kulturflasche 0,1 ml des Mitosehemmstoffes Colcemid zugegeben und weiter bei 37°C/5% CO₂ inkubiert. Colcemid ist ein synthetisches Derivat von Colchicin, einem Alkaloid der Herbstzeitlose. Dieses „Spindelgift“ verbindet sich nach dem Eintritt in die Zelle mit dem Mikrotubulussystem und bewirkt die Disaggregation der Tubulinuntereinheiten, was zu einer Hemmung der Zellteilung in der Metaphase führt (Buddecke, 1989). Nach dem Lösen der Zellen vom Boden der Flaschen durch vorsichtiges Aufschütteln wird die Zellsuspension in 15 ml - Röhrchen überführt und 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes erleichtert die Zugabe von 10 ml hypotoner Lösung sowie eine 20-minütige Inkubation bei 37°C die Spreitung der Chromosomen durch osmotische Lyse der Zellen. Zum Anfixieren gibt man vor dem erneuten Zentrifugieren 1 ml Fixativ zu. Methanol denaturiert und präzipitiert Proteine durch Dehydratation in saurer Umgebung, während die Essigsäure Nukleoproteine koaguliert und in Verbindung mit Wasser aus der Luft zu einer Zellschwellung bzw.

einer „Chromosomendehnung“ führt (Ronne et al., 1979; Hliscs et al., 1997). Um die Suspension von den Erythrozyten und den Plasmaresten weitgehend zu säubern, erfolgt ein dreimaliges Waschen nach folgendem Schema: Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde 10 ml Fixativ hinzugegeben, die Zellen gut resuspendiert und bei 1500 U/min 5 min zentrifugiert. Nach dem Waschen werden die Zellen in 1-3 ml Fixativ, je nach Menge des Zellsedimentes, gelöst, wobei die Suspension leicht trüb sein sollte. Vor dem Auftropfen auf den Objektträger (OT) wird die Suspension für mindestens 45 min auf Eis gestellt. Man kann sie so über Jahre bei -20°C lagern.

5.2.1.1 Auftropfen der Zellsuspension auf den Objektträger

Da die Sauberkeit des OT eine wichtige Voraussetzung für eine optimale Spreitung der Chromosomen ist, wird dieser vor dem Auftropfen der Zellsuspension mit Seidenpapier gründlich gereinigt oder über Nacht in Prilwasser gestellt und bis zur Verwendung in einem Methanol-Salzsäure-Gemisch gelagert. Der zuvor in 4°C kaltes Wasser gestellte OT wird schräg in eine erwärmte, feuchte Kammer gelegt und die Suspension mit Hilfe einer Pipette aufgetropft. Sind die Mitosen sehr plasmahaltig, kann nach ca. 20 Sekunden mit Fixativ nachgetropft und somit der Verdunstungsvorgang verlängert werden. Anschließend wird der OT bei 50°C auf einer Heizplatte getrocknet. Die Verdunstung des Fixativs bewirkt dabei die „Fixierung“ der aufgetropften Interphasekerne und Metaphasen auf dem OT sowie gleichzeitig eine Spreitung und Dehnung der Chromosomen (Hliscs et al., 1997). Je nach gewünschter Anzahl der Mitosen kann die Suspension durch eine zusätzliche Zugabe von Fixativ verdünnt werden, während eine Zentrifugation und Abnahme des Überstandes zu einer Erhöhung der Mitosezahl auf dem OT führt.

Nach Lufttrocknung und Dehydratation durch die aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) werden die getropften OT durch eine mehrtägige Lagerung bei Raumtemperatur „gealtert“. Die restliche Lymphozytensuspension kann in Fixativ bei -20°C dauerhaft gelagert werden.

5.2.1.2 Pepsindigestion und Fixierung

Um die auf den OT befindlichen Chromosomen für die DNA-Moleküle zugänglicher zu machen und die Hintergrundfärbung zu reduzieren (Proteine bieten unspezifische

Bindungsstellen für Avidin/Anti-Digoxigenin), ist es notwendig, Zellkernbestandteile und Zytoplasma mit Pepsin zu entfernen. Dazu werden die OT in einer 37°C warmen HCl-Pepsin-Lösung 4 Minuten im Wasserbad inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur 5 Minuten in 1x PBS gewaschen, um die Reaktion zu stoppen. Die Temperatur von 37°C sollte genau eingehalten werden, um die proteolytische Wirkung des Enzyms gewährleisten zu können. Durch die folgende zehnmündige Einwirkung einer 1%igen Postfixierungslösung unter einem Deckglas bei Raumtemperatur werden die Chromosomen und Interphasekerne dauerhaft auf dem OT fixiert, um einen weiteren Verlust des Materials während der folgenden Arbeitsschritte zu vermeiden. Anschließend werden die OTs erneut 5 Minuten in 1x PBS gewaschen, in der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 95%, 100%) dehydriert und luftgetrocknet, um alle Rückstände zu entfernen und so die nicht sofort benötigten OT dauerhaft bei -20°C lagern zu können.

5.2.2 Markierung der genomischen DNA-Sonden

Um die DNA-Sonden nach der Hybridisierung nachweisen zu können, wurden sie mittels Nick-Translation und DOP-PCR indirekt markiert (siehe 3.5.3). Dabei wird ein Nukleotid mit einem angekoppelten Reportermolekül in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut und nach der Hybridisierung durch Bindung eines Fluorochromtragenden Antikörpers oder Liganden nachgewiesen.

5.2.2.1 Nick - Translation

Durch die Verwendung eines Nick-Translations-Kit wurde eine standardisierte, effektive und einfache Markierung der DNA-Sonden mit Biotin oder Digoxigenin (DIG) gewährleistet. Das Verhältnis von Biotin-16-dUTP oder Digoxigenin-16-dUTP ist so gewählt, daß jedes 20.-25. Nukleotid der neu synthetisierten DNA ein mit Biotin oder Digoxigenin modifiziertes Nukleotid ist, während die enthaltene Menge an DNase I für Fragmentlängen zwischen 200 und 500 bp sorgt. Unter einer Laminarbox wurden in einem 4°C kalten Kühlakku bis zu 1 µg DNA in 16 µl aqua iniectionis sowie 4 µl des Nick-Translation-Mix mit den entsprechend markierten Nukleotiden pipettiert, sorgfältig gemischt und kurz abzentrifugiert. Die Synthese des markierten DNA-Stranges erfolgte während einer 90minütigen Inkubation bei 15°C im Thermal Cycler

und wird anschließend durch 10minütiges Erhitzen auf 60°C und die dadurch bewirkte Inaktivierung der Polymerase gestoppt.

5.2.2.2 PCR mit degenerierten Oligonukleotidprimern

Die DOP-PCR (PCR mit degenerierten Oligonukleotidprimern) eignet sich zur gleichzeitigen Amplifizierung und Markierung der genomischen DNA. Es wurde das folgende, nach Senger 1996 modifizierte Protokoll verwendet. In Tabelle 8 sind die verschiedenen Lösungen, welche in den einzelnen Reaktionsschritten der DOP-PCR verwendet wurden, aufgeführt.

Tabelle 8 Zusammensetzung der Lösungen für die DOP-PCR

<u>Lösung A (5 µl)</u>		
<u>Stammkonzentration</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>pro DNA-Sonde</u>
bis zu 200 ng DNA in 3,37 µl Aqua ad iniectabila		3,37 µl
5x Sequenase Reaction Buffer	0,6 x	0,6 µl
40 µM DOP-Primer	5 µM	0,63 µl
10 mM dNTP-Mix	0,8 mM	0,4 µl

<u>Lösung B (2 µl)</u>		
13 U/µl T7 Sequenase	1,6 U/µl	0,25 µl
Sequenase Dilution Puffer		1,75 µl

<u>Lösung C (50 µl)</u>		
Aqua ad iniectabila		34,22 µl
10x Stoffel Fragment Puffer	1x	5 µl
10 mM dNTP-Mix	0,88 mM	4,4 µl
40 µM DOP-Primer	1,1 µM	1,38 µl
25 mM MgCl ₂	2,5 mM	5 µl

Lösung D (5 µl)		
Aqua ad iniectabilia		3,5 µl
1x Stoffel Fragment Puffer	0,1x	0,5 µl
1 U/µl AmpliTaq DNA Polymerase, Stoffel Fragment	0,1 U/µl	0,5 µl
25 mM MgCl ₂	2,5 mM	0,5 µl

Die Herstellung aller Lösungen erfolgte mit sterilem pyrogenfreiem Aqua ad iniectabilia, um eine Kontamination mit Fremd-DNA oder Nukleasen zu vermeiden. Der degenerierte Oligonukleotidprimer (Sequenz: 5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3') wurde von Herrn Dr. E. Birch-Hirschfeld (Institut für Viologie, Jena) synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die DOP-PCR wurde nach Vorbereitung von Lösung A in einem Peltier Thermal Cycler mit beheiztem Deckel unter einer sterilen Werkbank gestartet. Zuerst erfolgen die Niedrig-Temperatur-Amplifizierungen mit Sequenase bei 37°C. Da der Cycler mit beheiztem Deckel arbeitet, tritt meist eine Temperaturabweichung ein, so daß die wahre Temperatur bei 37°C liegt. Da die Sequenase ein hitzeempfindliches Enzym ist, muß es nach jedem Denaturierungsschritt erneut mit Lösung B zugegeben werden. Wie bei der Zugabe aller anderen Lösungen in den Reaktionsansatz verbleiben die Reaktionsgefäße im Thermal Cycler, womit eine stabile Temperatur gewährleistet ist. In Tabelle 9 ist das Programm der DOP-PCR dargestellt.

Tabelle 9 PCR-Programm der DOP-PCR

	<u>Temperatur</u>	<u>Zeitdauer</u>	
1.	92°C	5 min	Denaturierung
2.	25°C	2:20 min	Zugabe der Sequenase (0,25 µl Lösung B) Primerannealing
3.	34°C	2 min	Elongation (Sequenase)
4.	90°C	1 min	Denaturierung

Die Schritte 2.-4. werden 7x wiederholt, dann folgen die spezifischen Amplifizierungen bei höheren Temperaturen. Zunächst werden 45 µl von Lösung C zugegeben, um das Volumen des Reaktionsansatzes zu erhöhen. Die anschließende

Denaturierung der Primer verhindert das Binden der degenerierten Primer untereinander.

5.	30°C	2:20 min	Zugabe von 45 µl Lösung C
6.	92°C	1 min	Denaturierung der Primer

Erst dann erfolgt die Zugabe der Stoffel Taq-Polymerase in Lösung D. Diese Polymerase besitzt im Gegensatz zur AmpliTaq®-Polymerase keine Exonukleaseaktivität und ist hitzestabiler.

7.	56°C	2:20 min	Zugabe von 5 µl Lösung D, Annealing
8.	70°C	2 min	Elongation (AmpliTaq, Stoffelfragment)
9.	0,1°/sek bis 74°C		
10.	92°C	1 min	Denaturierung
11.	56°C	1 min	Annealing
12.	70°C	2 min	Elongation (AmpliTaq, Stoffelfragment)
13.	0,1°/sek bis 74°C		

Die Schritte 10-13 werden 31x wiederholt.

14.	72°C	10 min	Elongation (Zeit zum Auffüllen der begonnenen Stränge)
15.	4°C	for ever	

Zur höheren Stabilität der DNA-Sonden gegenüber Nukleasen wurden nach der DOP-PCR pro Ansatz 1 µl EDTA zugegeben. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. In Tabelle 10 ist der PCR-Ansatz für die anschließende Markierung aufgeführt.

Tabelle 10 Ansatz der Markierungs-PCR (22,2 µl)

<u>Stammlösung</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>pro DNA-Sonde</u>
Aqua ad iniectabilia		12,08 µl
die zuvor mit DOP-PCR amplifizierte DNA		2 µl
20x Replitherm Puffer	0,9x	1 µl
40 µM DOP-Primer	1,8 µM	1 µl
10x dNTP Label-mix	0,9x	2 µl
25 mM MgCl ₂	2,25 mM	2 µl
5 U/µl AmpliTaq® Polymerase	0,03 U/µl	0,12 µl
1 mM Biotin-16-dUTP oder 1 mM Digoxigenin-11-dUTP	45 µM	1 µl

Der dNTP Label-mix enthielt dTTP, dATP, dCTP sowie dGTP und wurde in geringerer Konzentration zugegeben, da anstelle von dTTP während der Markierungs-PCR das Nukleotid mit dem gewünschten Reportermolekül (Biotin oder Digoxigenin) eingebaut wurde. Tabelle 11 stellt das PCR-Programm zur Markierung der in der DOP-PCR amplifizierten DNA-Sonden dar. Auch hierbei wurde ein PCR-Cycler mit beheiztem Deckel verwendet.

Tabelle 11 PCR-Programm zur Markierung der DNA-Sonden nach DOP-PCR

	<u>Temperatur</u>	<u>Zeitdauer</u>	
1.	92°C	3:00 min	initiale Denaturierung
2.	91°C	1:00 min	Denaturierung
3.	56°C	1:00 min	Primerannealing
4.	70°C	2:00 min	Elongation
die Schritte 2 - 4 wurden 19x wiederholt			
5.	72°C	5:00 min	
6.	4°C	for ever	

5.2.2.3 Bestimmung der Fragmentlängen und Reinigung der Sonden-DNA

Nach der Markierung der Sonden-DNA mit Nick-Translation oder DOP-PCR empfiehlt es sich, die Fragmentlängen der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese zu bestimmen. Die durch den für diese Arbeit verwendeten Nick-Translations-Kit hervorgerufene Länge von 200-500 bp hat sich in der FISH als günstig erwiesen. Wie

bereits in 0 beschrieben, wurde ein 1,2 %iges Agarose-Gel hergestellt und ein Teil der markierten DNA elektrophoretisch aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte ebenfalls nach Anregung mit einem Transilluminator durch eine Kamera und einem Videoprinter. Mit Hilfe eines Längenstandards konnten die Fragmentlängen der PCR-Produkte bestimmt werden.

Vor einer weiteren Benutzung der markierten DNA ist es erforderlich, übriggebliebene Reagenzien der Markierungsreaktionen mittels Alkoholfällung zu entfernen und gleichzeitig das Volumen zu verringern. Dazu wurde zu jeder Probe 0,5 Volumenteile t-RNA, 0,1 Volumenteile 3 M Natriumacetat (Endkonzentration 0,3 M Natriumacetat) und 2,5 Volumenteile Ethanol (abs.) pipettiert. Nach Zugabe des monovalenten Salzes und des Alkohols fällt die DNA spontan aus.

Die tRNA erhöht die absolute Ausbeute an DNA und verhindert bei der Hybridisierung, daß die Sonde mit unspezifischen Sequenzen hybridisiert. Nach einer einstündigen Lagerung bei -20°C und der Zentrifugation bei 15000 rpm über 15 Minuten bei 4°C wurde das Pellet 2 Minuten in der SpeedVac getrocknet. Anschließend wird es bei 50°C im Heizblock 30 Minuten in 12 µl Hybridisierungsmix gelöst, welcher Dextransulfat und Formamid enthält. Dextran ist ein inertes Polymer mit hohem Molekulargewicht, das die Geschwindigkeit der Hybridisierung verdreifacht. Es bildet eine Matrix in der Hybridisierungslösung, so daß die Sonde lokal konzentriert wird, ohne die Stringenz zu beeinflussen. Das Formamid destabilisiert die Wasserstoffbrückenbindungen und setzt so die Schmelztemperatur der DNA herab.

5.2.3 Die eigentliche *in situ* Hybridisierung

5.2.3.1 Denaturierung der Metaphase-Präparate

Vor der Hybridisierung ist es notwendig, die DNA-Sonden und die Metaphase-Präparate zu denaturieren. Dazu werden die OT's auf einer 72°C heißen Heizplatte vorgewärmt und anschließend mit 100 µl 70% Formamid überschichtet und 3 Minuten inkubiert. Formamid schont die Strukturen auf dem OT durch die Senkung der für die Denaturierung doppelsträngiger DNA nötige Schmelztemperatur, die sonst zu hoch und die Inkubationszeit zu lang wäre, indem es die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA destabilisiert. Nach der Inkubation wird der

OT in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 95%, 100% Ethanol, je -20°C kalt) dehydriert und luftgetrocknet.

5.2.3.2 Prähybridisierung der DNA-Sonden

Vor der eigentlichen Hybridisierung wurden die DNA-Sonden mit einem Überschuß an unmarkierter repetitiver DNA (Cot1-DNA) prähybridisiert, um Kreuzhybridisierungen mit anderen chromosomalen Regionen zu vermeiden und eine Blockade repetitiver Sequenzen zu erreichen (siehe 3.6). Dazu wurden 5 µl DNA-Sonde, 7 µl Hybridisierungsmix und je nach Ansatz eine geringe Menge Cot1-DNA (5 µg) oder eine große Menge (40 µg) im Heizblock bei 52°C zugegeben, um ein unterschiedliches Maß an Blockierung zu erreichen. Das Volumen der Cot1-DNA wurde von der Menge an Hybridisierungsmix abgezogen, so daß das Endvolumen 12 µl betrug. Während der Prähybridisierung, welche im PCR-Cycler mit beheiztem Deckel durchgeführt wurde (Tabelle 12), erfolgt die Anlagerung der Cot1-DNA an die DNA-Sonden.

Nach diesem Prähybridisierungsschritt werden die DNA-Sonden möglichst schnell auf die luftgetrockneten, denaturierten OT gegeben, wobei eine Probe mit 12 µl Hybridisierungsgemisch auf jeweils einen halben OT gegeben wird, um die DNA-Menge auf kleiner Hybridisierungsfläche groß zu halten. Anschließend wird die OT-Hälfte mit einem Deckglas 24 x 24 mm abgedeckt und mit Fixogum, einem flexiblen Kleber luft- und wasserdicht abgeschlossen, um ein Austrocknen zu vermeiden. Anschließend werden die OT in einer feuchten Kammer bei 37°C über 3-72 h inkubiert. Es sollte eine kurze Zeitspanne zwischen Denaturierung beider Hybridisierungspartner und der eigentlichen Hybridisierung eingehalten werden, um eine Renaturierung zu vermeiden.

Tabelle 12 Prähybridisierungsprogramm

	<u>Temperatur</u>	<u>Zeitdauer</u>	
1.	75°C	5:00 min	Denaturierung
2.	4°C	3:00 min	schnelles Abkühlen, um Renaturierung zu vermeiden

3.	37°C	30:00 min	Anlagerung der Cot1-DNA
4.	37°C	for ever	

5.2.4 Posthybridisierungswaschungen

Um den OT von ungebundenen DNA-Sonden zu reinigen, wird er nach vorsichtiger Entfernung des Deckglases zahlreichen Waschschritten unterzogen. Dabei wurden drei unterschiedliche gebräuchliche Protokolle verwendet:

Protokoll 1:

1. 3x 5 min mit 50 % Formamid bei 37°C
2. 3x 5 min mit 2x SSC bei 37°C
3. kurz in 4x SSCT bei RT tauchen

Protokoll 2:

1. 3x 5 min mit 50 % Formamid bei 42°C
2. 3x 5 min mit 2x SSC bei 42°C
3. kurz in 4x SSCT bei RT tauchen

Protokoll 3:

1. 3x 5 min mit 50 % Formamid bei 42°C
2. 3x 5 min mit 2x SSC bei 42°C
3. 3x 5 min mit 0,1x SSC bei 60°C
4. kurz in 4x SSCT bei RT tauchen

Bei einer weiteren Inkubation mit 100 µl SSCTM unter Verwendung eines 24 x 60 mm Deckglases bei 37°C für 15 min in einer feuchten Kammer werden unspezifische Bindungen blockiert.

5.2.5 Detektion, Gegenfärbung und Aufnahme

5.2.5.1 Detektion

Nach dem letzten Waschschrift kann die Lokalisation der hybridisierten Sonden-DNA durch Detektion nachgewiesen werden. Bei der hier angewendeten indirekten Markierung werden Nukleotide mit Reportermolekülen (Biotin oder Digoxigenin) mittels Nick-Translation oder DOP-PCR in die Sonden-DNA eingebaut. Diese können

nun spezifisch durch ein Fluorochrom-tragendes Protein oder einen anderen Liganden mit einer hohen Affinität zu diesen Reportermolekülen detektiert werden. Um die Erkennung der markierten Nukleotide durch die Antikörper oder Liganden zu erleichtern, tragen die Reportergruppen Spacer, die aus der DNA herausragen. Der Nachweis von Biotin beruht dabei auf einer irreversiblen Bindung zwischen dem Fluorochrom-tragenden Streptavidin, ein von *Streptomyces avidinii* sezerniertes Protein, und Biotin, einem Vitamin-H-Abkömmling. Diese Bindung besitzt eine der höchsten in der Biologie bekannten Affinitätskonstanten (Strachan und Read, 1996b). Die für diese Detektion notwendige Antikörperlösung enthielt 0,3 µl Streptavidin-FITC und 74,7 µl SSCTM. FITC ist das angekoppelte Fluorochrom. Digoxigenin, ein Pflanzensteroid aus *Digitalis purpurea*, hingegen wird immunologisch mit Anti-DIG-Rhodamin nachgewiesen (Strachan und Read, 1996b). Der spezifische Digoxigenin-Antikörper (Anti-DIG) ist mit dem Fluorochrom Rhodamin verbunden. Die Antikörperlösung enthält 7 µl Anti-DIG-Rhodamin und 68 µl SSCTM. Nach Zugabe der Antikörperlösungen wurde der OT mit einem 24x60 mm Deckglas abgedeckt und weitere 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wird erneut für 8 Minuten in 4x SSCT bei Raumtemperatur auf einem Schüttler gewaschen, durch eine aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 95%, 100%) dehydriert und dunkel luftgetrocknet.

5.2.5.2 Gegenfärbung

Die Überschichtung des hybridisierten und detektierten OT mit 15 µl DAPI-Antifade-Lösung dient der Gegenfärbung der Chromosomen und dem Schutz vor einem Ausbleichen der Fluorochrome. DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phenylindol) ist ein in der FISH weit verbreiteter Fluoreszenzfarbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 353 nm und einem Emissionsmaximum bei 416 nm, der an die kleine Krümmung der DNA-Doppelhelix bindet, und so eine der Giemsa-ähnliche Bänderung erzeugt. Die Fluoreszenz von DAPI wird durch AT-reiche Sequenzen stark verstärkt, wodurch sich die stärkere Fluoreszenz der Zentromerregionen erklärt (Wilson et al., 1990).

Der fertige OT kann sofort unter dem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet oder bei -20°C bis zu mehreren Jahren (je nach Fluoreszenzfarbstoff) gelagert werden.

5.2.5.3 Aufnahme

Belichtung und Aufnahme der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte mit einem Axioplan® 2 Fluoreszenz-Mikroskop mit einer angekoppelten CCD-Videokamera. Um die einzelnen Fluoreszenzen zu trennen, werden zwischen die Quecksilberlampe und die Kamera Filter eingeschoben. Beide Fluorochrome besitzen unterschiedliche Emissionswellenlängen (FITC: 525 nm, Rhodamin: 605 nm) und können so getrennt voneinander aufgenommen werden.

Für die Auswertung und Dokumentation der Hybridisierungsergebnisse wurde das Software-Programm ISIS (MetaSystems GmbH, D) verwendet.

5.2.6 Comparative Genomic Hybridization

Die Comparative Genomic Hybridization (vergleichende Genomhybridisierung, CGH) bietet die Möglichkeit, zwei genomische DNA-Sonden unterschiedlicher Herkunft in einem Experiment objektiv zu vergleichen (Kallioniemi et al., 1992; siehe 3.5.2).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Versuchsansätze durchgeführt:

1. der Vergleich zwischen Natriumbisulfit behandelte Normal-DNA (Test-DNA) und unbehandelte Normal-DNA (Referenz-DNA) sowie
2. der Vergleich zwischen Tumor-DNA aus CML-Proben (Test-DNA) und Normal-DNA (Referenz-DNA), beide jeweils Natriumbisulfit behandelt

Die Vorbereitung und Durchführung der CGH entsprach den Protokollen für die *in situ* Hybridisierung. Die Test-DNA wurde mit Digoxigenin-tragenden Nukleotiden markiert und durch einen Antikörper mit dem Fluorochrom Rhodamin (rot) detektiert, während die Referenz-DNA mit Biotin-tragenden Nukleotiden markiert und durch Streptavidin-FITC (grün) nachgewiesen wurde. Das Verhältnis zwischen rotem und grünen Signal beschreibt einen relativen Überschuss bzw. Mangel der Test-DNA gegenüber der Referenz-DNA.

Nach den gleichen Vorbereitungen der Sonden-DNA wurden die Test-DNA und die Referenz-DNA zusammen auf eine Hälfte des Objektträgers gegeben, mit Fixogum Kleber luftdicht verschlossen und unter gleichen Bedingungen wie bei FISH hybridisiert. Posthybridisierungswaschungen, Detektion und Gegenfärbung waren ebenfalls identisch. Die Aufnahme erfolgte mit einem Axioplan® 2 Fluoreszenz-

Mikroskop mit einer angekoppelten CCD-Videokamera und die CGH-Auswertung mit dem Software-Programm ISIS (MetaSystems GmbH, D).

Da die Qualität der CGH extrem von den Charakteristika der Metaphasen auf dem OT abhängig ist, wurden nur solche in die Auswertung einbezogen, deren Chromosomen nicht zu kurz sind und die sich nicht überlappen. Um die Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten zwischen verschiedenen Metaphasen sowie verschiedenen OTs vergleichen zu können, ist es notwendig, die roten und grünen Fluoreszenzintensitäten zu standardisieren. Die Durchschnittsintensität wird mit 1.0 für die ganze Metaphase angegeben. Individuell können danach die Schwellenwerte eingestellt werden, bei deren Unterschreitung ein Kopieverlust bzw. bei deren Überschreiten ein Zugewinn identifiziert werden kann. Es wurde 0,85 (grün) und 1,15 (rot) festgelegt.

5.3 Bisulfitreaktion und Hybridisierung an Metaphasechromosomen

Bei dieser Methode erfolgte die Natriumbisulfitreaktion auf den Metaphasechromosomen der zu untersuchenden DNA-Proben. Es wurde anschließend neben unbehandelter markierter gesamtgenomischer DNA eines unauffälligen Probanden auch eine Standardsonde mit chromosomalen Material des Chromsoms 1 (wcp #1, whole chromosome painting) hybridisiert.

Die Metaphasepräparate wurden mit den oben beschriebenen Methoden hergestellt (siehe 5.2.1). Als Sonden-DNA wurde gesamtgenomische DNA aus kultivierten Lymphozyten gesunder Probanden verwendet (siehe 5.1.1). Um die auf dem OT fixierte DNA für Natriumbisulfit zugänglich zu machen, wurde der OT zunächst nach dem zytogenetischem Protokoll denaturiert (siehe 5.2.3.1). Nachdem er auf einer Heizplatte auf 72°C vorgewärmt wurde, erfolgte bei dieser Temperatur eine dreiminütige Inkubation mit 70% Formamid/SSC-Lösung mit anschließender Dehydrierung durch die aufsteigende Ethanolreihe (70%, 95%, 100%). Anschließend wurde der OT mit 100 µl 3 M Natriumbisulfit über 4 Stunden unter Lichtabschluß bei 55°C inkubiert. Die dabei eingesetzten Konzentrationen sowie die Reaktionszeit orientierte sich an den in 5.1.3 beschriebenen Protokollen der Natriumbisulfitreaktion nach Clark et al. 1994. Nach der Inkubation wurde der OT mit PBS 3x 5 min bei RT

gewaschen, gefolgt von einer zehnminütigen Behandlung mit 3 M Natriumhydroxid entsprechend dem molekulargenetischen Verfahren der Bisulfitreaktion (siehe 5.1.3). Danach erfolgte ein erneuter Waschschrift mit 3x 5 Minuten PBS bei RT und einer Dehydrierung in der aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 95%, 100%). Nach Lufttrocknung konnte der OT bei -20°C gelagert oder sofort für die Hybridisierungen verwendet werden.

Die *in situ* Hybridisierung der unbehandelten gesamtgenomischen Sonden-DNA sowie einer Standardsonde (wcp#1) auf die OT wurde nach den oben beschriebenen Protokollen für diese zytogenetische Methode durchgeführt (siehe 5.2). Alle verwendeten DNA-Sonden wurden mit Nick-Translation indirekt mit Biotin-tragenden Nukleotiden markiert und mit Streptavidin-FITC detektiert. Die Gegenfärbung und Aufnahme erfolgte ebenfalls nach den genannten Protokollen.

5.4 Reagenzien und Geräte

Tabelle 13 Reagenzien zur Vorbereitung der Metaphasepräparate

	<u>Zusammensetzung, Hersteller</u>
Aqua ad iniectabila	Braun, D
Colcemide, 10µg/ml	Seromed, D
Ethanol 100%	Merck, D
Fixativ	Eisessig (Roth, D) : Methanol (Merck, D) = 1:3, 4°C
HCl-Pepsin-Lösung	5ml 0,2n HCl + 95ml aqua ad iniectabila + 500µl Pepsin (2500 units/mg Substanz, 3100 units/mg Protein, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D) pH 2,0
hypotone Lösung	0,559 g KCl (Merck, D) in 100ml
Methanol-HCl-Lösung	35% Methanol + 1% HCl (32%) + 64% Aqua ad iniectabila
Paraformaldehyd-Lösung	2g Paraformaldehyd in 100 ml PBS
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffert saline = PBS)	Seromed (Biochrom KG), 9,55 g in 1000 ml Aqua ad iniectabila
Postfixierungslösung, 1%	2,5 ml 1 M MgCl ₂ (50 mM) + 22,5 ml 1x PBS + 25 ml Paraformaldehyd-Lösung

Tabelle 14 Reagenzien für die Markierung der genomischen DNA-Sonden

	<u>Firma, Herstellung</u>
Agarose NuSieve 3:1	FMC BioProdukts, USA
AmpliTa [®] DNA Polymerase, 5 U/µl	Perkin Elmer [®] , USA
AmpliTa [®] DNA Polymerase, Stoffel Fragment, 10 U/µl	Perkin Elmer [®] , USA
Aqua ad iniectabila	Braun, D
5x Biotin-Nick-Translations-Kit	stabilisierter Reaktionspuffer in 50 % Glycerin (v/v), DNA Polymerase I, DNase I; je 0,25 mM dATP, dCTP, dGTP; 0,17 mM dTTP; 0,08 mM Biotin-16-dUTP (Boehringer Mannheim, D)
5x DIG-Nick-Translations-Kit	stabilisierter Reaktionspuffer in 50 % Glycerin (v/v), DNA Polymerase I, DNase I; je 0,25 mM dATP, dCTP, dGTP; 0,17 mM dTTP; 0,08 mM Digoxigenin-16-dUTP (Boehringer Mannheim, D)
1 mM Biotin-16-dUTP	Boehringer Mannheim, D
1 mM Digoxigenin-11-dUTP	Boehringer Mannheim, D

40 µM DOP-Primer	freundlicherweise von Dr. E. Hirsch-Birchfeld zur Verfügung gestellt
EDTA	
Ethanol 100%	Merck, D
2000x Gelfarbstoff GelStar® Nucleic Acid Gel Stain	2 µl 10000x Gelfarbstoff GelStar® Nucleic Acid Gel Stain (BioWhittaker Molecular Applications, USA) + 8 µl 1x TE-Puffer
Ladepuffer	95% Formamid + 20 mM EDTA + 0.05% Bromphenolblau + 0.05% Xylencyanol
Längenstandard II und VIII	Boehringer Mannheim, D
25 mM MgCl ₂	Perkin Elmer®, USA
10mM dNTP-Mix	äquivalente Mengen 10mM GeneAmp® dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2,5 mM ea.) (Perkin Elmer®, USA)
10x dNTP Label-Mix	1 mM dTTP, jeweils 2 mM dATP, dCTP, dGTP
3 M Natriumacetat	24,6 g wasserfreies Natriumacetat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D) in 100 ml H ₂ O lösen und auf pH 4,8 - 5,2 mit Essigsäure einstellen
Hybridisierungsmix	2 g Dextransulfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D) + 2 ml 20x SSC + 2 ml 0,5 M Natriumphosphat + 5 ml deionisiertes Formamid ad 10 ml mit H ₂ O (bei 70°C (3 h) lösen)
20x Replitherm Puffer	Epicentre
5x Sequenase Reaction Buffer	200 mM Tris-HCl, pH 7,5 + 100 mM MgCl ₂ + 250 mM NaCl (Amersham®, USA)
Sequenase Dilution Buffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 + 10 mM 2-Mercapto-ethanol
T7 Sequenase version 2.0 DNA, 13 U/µl	Amersham, USA
10x Stoffel Fragment Puffer	Perkin Elmer®, USA
10x TBE-Puffer	1.34 mM Tris-Base + 45 mM Borsäure + 25 mM EDTA, aqua ad iniectionabilia
1x TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) + 1 mM EDTA (pH 8,0)
tRNA	100 mg E.coli (10 µg/µl, Boehringer Mannheim, D) ad 10 ml aqua ad iniectionabilia

Tabelle 15 Reagenzien für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

	<u>Firma, Herstellung</u>
Aqua ad iniectabilia	Braun, D
Aqua dest.	Mit Seralpur Delta (Seral®) hergestelltes Reinstwasser (deionisiert, organisch rein, partikelfrei), zusätzlich autoklaviert
Ethanol 100%	Merck, D
70% Formamid	350 ml Formamid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D) + 50 ml 20x SSC + 100 ml aqua dest.
Cot1-DNA	500µg, 1 mg/ml in 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) + 1 mM EDTA (GibcoBRL, D)
Hybridisierungsmix	2 g Dextransulfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D) + 2 ml 20x SSC + 2 ml 0,5 M Natriumphosphat + 5 ml deionisiertes Formamid ad 10 ml mit H ₂ O (bei 70°C (3 h) lösen)

Tabelle 16 Reagenzien für die Posthybridisierungswaschungen

	<u>Firma, Herstellung</u>
50 % Formamid	250 ml Formamid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D) + 50 ml 20x SSC + 200 ml aqua dest.
SSCTM	0,5 g fettfreie Trockenmilch (Marvel) in 5 ml 4x SSCT lösen, 5 min bei 1500 rpm zentrifugieren, obere Schicht verwerfen
20x SSC	87,65 g NaCl ₂ + 44,10 g Natriumcitrat, ad 500 ml aqua dest.
2x SSC	50 ml 20x SSC + 450 ml aqua dest.
0,1x SSC	2,5 ml 20x SSC + 450 ml aqua dest.
4x SSCT	100 ml 20x SSC + 400 ml aqua dest. + 250 µl Tween 20

Tabelle 17 Reagenzien für Detektion, Gegenfärbung und Aufnahme

	<u>Firma, Herstellung</u>
Anti-DIG-Rhodamin	Boehringer Mannheim, D
DAPI-Antifade-Lösung	4 µl DAPI (4'6'-Diamidino-2-Phenylindol, 50 mg/ml) in 1 ml Vectashield® Mounting Medium (Antifade), Lagerung bei 4°C
Ethanol 100%	Merck, D

4x SSCT	100 ml 20x SSC + 400 ml aqua dest. + 250 µl Tween 20
SSCTM	0,5 g fettfreie Trockenmilch (Marvel) in 5 ml 4x SSCT lösen, 5 min bei 1500 rpm zentrifugieren, obere Schicht verwerfen
Streptavidin - Fluorescein-5-iso-thiocyanat (FITC)	Boehringer Mannheim, D
Vectashield® Mounting Medium	Camon Vector Laboratories H-1000

Tabelle 18 Geräte

	<u>Firma</u>
Axioplan® 2 Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss, D
Begasungsbrutschrank	Forma Scientific Inc., USA
CCD-Videokamera	IMAC®, D
Fixogum	Rupper Cement
Gelelektrophoreseeinheit mit Stromversorgung	Serva Feinbiochemica GmbH & Co., D Elektrophoresis Power Supply ST305; GIBCO BRL
Gewebekulturflaschen für Suspensionskulturen mit schrägem Hals, steril, 50 ml Volumen	Greiner, D
Heizblock	
Objektträger (OT), Deckglas	Menzel-Superfrost, D
Peltier Thermal Cyclers 200	MJ Research, USA
15 ml - Röhrchen, spitz	Falcon, D
Seidenpapier	Macherey-Nagel, D
SpeedVac DNA 100	
UV-Transilluminator mit Dokumentationseinheit	UV Emitter TFX53M DocuGel-V Mitsubishi Videoprinter Kamera

6 Ergebnisse

6.1 Molekulargenetische Methoden

6.1.1 Natriumbisulfitreaktion und methylspezifische Polymerasekettenreaktion

Die Natriumbisulfitreaktion konvertiert unmethylierte Cytosine in Uracile, während die methylierten Basen unverändert bleiben (siehe 3.4.1). Es wurde zunächst das Protokoll nach Clark und Mitarbeiter verwendet (Clark et al., 1994). Dies sah eine Reaktionszeit von 16 Stunden bei 55°C vor. Außerdem wurde die Reaktion für 4 Stunden bei dieser Temperatur durchgeführt sowie alternativ eine Stunde bei 95°C. Diese Parameter wurden von Grunau und Mitarbeiter als optimal beschrieben (Grunau et al., 2001). Die Auswirkungen dieser Änderungen sind anhand der Messung der DNA-Konzentration mit dem Spektrometer nach der Umwandlung sowie an den Ergebnissen der methylspezifischen Polymerasekettenreaktion erkennbar. Nur nach einer Reaktionszeit von 16 Stunden bei 55°C konnte ein amplifizierbares und vollständig deaminiertes PCR-Produkt nachgewiesen werden. Nach 4 Stunden Reaktionszeit zeigte die Messung der DNA-Konzentration nur einen geringeren DNA-Verlust, nach der MSP konnte jedoch kein eindeutiges Ergebnis der Natriumbisulfitreaktion dargestellt werden. Nach einer Stunde bei 95°C war nur eine geringe DNA-Menge messbar. Es wurden insgesamt 205 Natriumbisulfitreaktionen und 152 methylspezifische PCR durchgeführt. Die Abb. 2 zeigt anhand zweier DNA-Proben mit methylierten Cytosinen in der Sequenz des Tumorsuppressorgens *p16* die Ergebnisse der methylspezifischen Polymerasekettenreaktion.

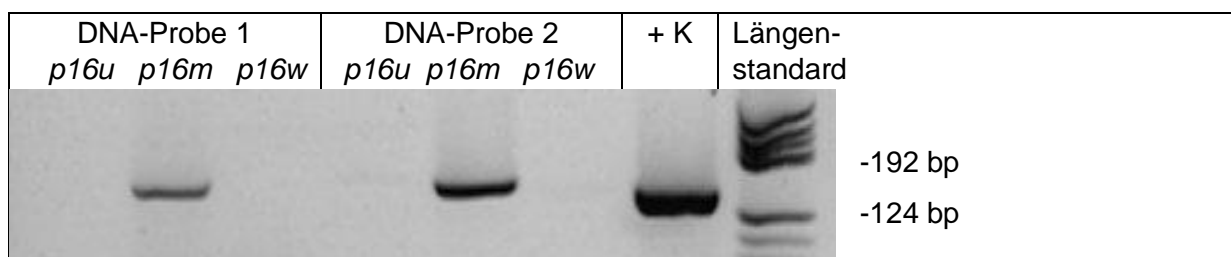


Abb. 2 Agarose-Gel mit zwei DNA-Proben nach methylspezifischer Polymerasekettenreaktion (MSP). Mit einem Teil jeder Probe wurde die MSP mit jeweils einem Primerpaar (*p16u*, *p16m*, *p16w*) durchgeführt. In beiden war die Sequenz des Tumorsuppressorgens *p16* methyliert, erkennbar an den Banden mit einer Länge von 150 bp. Eine Positivkontrolle (+ K) wurde mitgeführt.

6.2 Zytogenetische Methoden

Bei der anschließenden Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) bildeten nur methylierte Bereichen einen komplementären DNA-Strang zu entsprechenden Sequenzen der Ziel-DNA auf dem Objektträger, da nur sie eine Homologie besaßen. Die Bindung dieser methylierten Bereiche wurde somit durch ein Fluoreszenzsignal sichtbar.

6.2.1 Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Es wurden jeweils 4 Hybridisierungen von Normal-DNA-Sonden und Tumor-DNA-Sonden (CML-DNA), welche beide zuvor mit Natriumbisulfit behandelt wurden und die ein eindeutiges Ergebnis nach der methylspezifischen PCR zeigten, durchgeführt. Von beiden wurden jeweils insgesamt 20 Metaphasen mit vollständigen Karyogrammen ausgewertet. Die Signalintensitäten der genomischen Regionen konnten anhand einer subjektiven Bewertung der Fluoreszenzstärke sowie durch ein Fluorochromprofil, welches mit einer Auswertungssoftware darstellbar war, ermittelt werden. Je höher die Signalintensität einer chromosomalen Region ist, desto größer ist die Anzahl der hybridisierten DNA-Sequenzen und folglich der Homologie zwischen Ziel-DNA auf den Metaphasen und der Sonden-DNA. Es wurden die Intensitäten des Fluoreszenzsignals zwischen Chromosomen derselben Metaphase sowie zwischen homologen Chromosomen für jeweils beide DNA-Proben verglichen. Außerdem erfolgte die Zuordnung des Fluorochromprofils zum Giemsa-Bandenmuster eines jeden Chromosoms.

6.2.1.1 Intensität des Fluoreszenzsignals von Chromosomenpaaren einer Metaphase

Hierbei wurde die Stärke des Fluoreszenzsignals eines Chromosomenpaares im Vergleich zu anderen Chromosomenpaaren derselben Metaphase bewertet. Dabei konnte festgestellt werden, daß bestimmte Chromosomenpaare auch unter verschiedenen Hybridisierungsbedingungen ein ähnlich starkes oder schwaches Signal aufwiesen. Zu diesen veränderten Hybridisierungsparametern zählten die Dauer der Hybridisierung, die eingesetzte Cot1-DNA-Menge, verschiedene

Waschprotokolle, die verwendeten Markierungsreaktionen und die eingesetzte Sonden-DNA-Konzentration.

In Tabelle 19 sind die Signalintensitäten von Chromosomen nach Hybridisierung mit Natriumbisulfit behandelter Normal-DNA bzw. nach Hybridisierung mit Natriumbisulfit behandelter CML-DNA dargestellt. Ausgehend vom oben beschriebenen Versuchsansatz entsprechen Regionen mit einer hohen Intensität des Fluoreszenzsignals Bereichen mit einer großen Zahl an methylierten Cytosinen. Regionen mit einer niedrigen Signalstärke können mit unmethylierten Sequenzen gleichgesetzt werden.

Tabelle 19 Intensitätsvergleich von chromosomalen Fluoreszenzsignalen nach Hybridisierung verschiedener DNA-Proben

	Normal-DNA	CML-DNA	in beiden DNA-Proben
Chromosomen mit hoher Signalintensität	3, 9, 10, 11, 21, Y	4, 18	1, 13, 14, 15, 19
Chromosomen mit niedriger Signalintensität	4, 18	3, 9, 10, 11, 16, 21, 22	2, 5, 6, 7, 8, 12, 17, 20, X

Chromosomen mit hoher oder niedriger Signalintensität nach der Hybridisierung mit Natriumbisulfit behandelter Normal-DNA bzw. CML-DNA. rechts: Chromosomenpaare mit hoher bzw. niedriger Signalintensität in jeweils beiden DNA-Proben

In den Versuchen mit Normal-DNA zeigten die Chromosomen 3, 9, 10, 11, 21 und Y eine starke Fluoreszenzfärbung, während die Chromosomen 4 und 18 nur schwach gefärbt waren. Nach Hybridisierung der CML-DNA wiesen die Chromosomen 4 und 18 eine hohe Signalintensität auf. Die Chromosomen 3, 9, 10, 11, 16 und 22 zeigten eine geringe Signalstärke. Die Intensität des Fluoreszenzsignals der Chromosomen 1, 13, 14, 15 und 19 war nach Hybridisierung beider DNA-Proben hoch, bei den Chromosomen 2, 5, 6, 7, 8, 12, 17, 20 sowie dem X-Chromosom dagegen niedrig.

6.2.1.2 Intensität des Fluoreszenzsignals von homologen Chromosomen

Es wurden die Stärken des Fluoreszenzsignals zweier homologer Chromosomen eines Chromosomenpaares in derselben Metaphase verglichen. Tabelle 20 stellt die beobachteten Signalstärkenunterschiede zwischen der mit Natriumbisulfit behandelten Normal-DNA bzw. CML-DNA nach Hybridisierung dar. Als identische

Signalstärken wurden dabei gleich hohe oder gleich geringe Intensitäten des Fluoreszenzsignals auf beiden Chromosomen gewertet.

Tabelle 20 Intensitätsvergleich von Fluoreszenzsignalen zwischen homologen Chromosomen nach Hybridisierung verschiedener DNA-Proben

	Normal-DNA	CML-DNA	in beiden DNA-Proben
homologe Chromosomen mit identischen Signalstärken	6, 8, 9, 11, 15, 16	2, 4, 10, 11, 15, 17, 21	1, 3, 18, 19, 20, 22, X
homologe Chromosomen mit unterschiedlichen Signalstärken	10, 13, 14, 21	6, 7, 8, 9	

Homologe Chromosomen mit identisch hohen oder niedrigen Signalstärken nach Hybridisierung mit Natriumbisulfit behandelter Normal-DNA (Spalte 2) bzw. CML-DNA (Spalte 3), rechts: homologe Chromosomen mit identischer Signalintensität in beiden DNA-Proben

Nach der Hybridisierung mit Normal-DNA zeigten die homologen Chromosomen 6, 8, 9, 11, 15 und 16 identische Signalstärken, während die Chromosomen 10, 13, 14 und 21 eine Differenz der Intensitäten der Fluoreszenzsignale aufwiesen. Unter Verwendung von CML-DNA waren die Signalstärken der Chromosomen 2, 4, 10, 11, 15, 17 und 21 identisch und der Chromosomen 6, 7, 8 und 9 unterschiedlich. In beiden DNA-Proben konnte bei den Chromosomen 1, 3, 18, 19, 20, 22 und X kein Unterschied in den Signalstärken beobachtet werden.

6.2.1.3 Zuordnung des Fluoreszenzsignals zu chromosomalen Regionen

In Abb. 3 wurde dem in der vorliegenden Arbeit ermittelten Signalprofil eines jeden Chromosoms spezifische hetero- oder euchromatische Banden zugeordnet. Dazu wurde anhand chromosomaler Ideogramme (nach ISCN, 1995) die genomische Lokalisation von hohen oder niedrigen Signalstärken dargestellt, die den beobachteten Fluoreszenzsignalen nach den Hybridisierungen mit Natriumbisulfit behandelter Normal-DNA (Abb. 3, Spalte 4) bzw. CML-DNA (Abb. 3, Spalte 5) entsprachen. Die Darstellung des Signalprofils nach der Hybridisierung mit Normal-DNA (Abb. 3, Spalte 4) ist nochmals in eine rechte und linke Spalte unterteilt, um die Ergebnisse nach Verwendung einer geringen Menge (5 µg, links) bzw. einer großen Menge (40 µg, rechts) Cot1-DNA wiederzugeben. Weiterhin sind symbolisch die

Bereiche, die mit einem 5-Methylcytosin-Antikörper nachgewiesen wurden (Abb. 3, Spalte 2; Barbin et al., 1994) und repetitive Sequenzen, welche durch Cot1-DNA blockiert werden können (Cot-Banding, Abb. 3, Spalte 3, Kallioniemi et al., 1992) dargestellt. Bei Hybridisierung mit CML-DNA wurde stets eine große Cot1-DNA-Menge (40 µg) verwendet, um möglichst wenig unspezifische Bindungen zu erhalten. Ein eigener Vorversuch mit CML-DNA ergab wenig aussagekräftige Ergebnisse bei Verwendung einer zu geringen Menge Cot1-DNA (10 µg).

Die Stärke des Fluoreszenzsignals der chromosomalen Regionen wurde in der graphischen Übersicht wie folgt dargestellt:

- weiß - Regionen ohne Fluoreszenzsignal, entsprechen Sequenzen mit zahlreichen unmethylierten Cytosinen
- hellgrau - chromosomale Bereiche mit unspezifischen Signalmustern
- dunkelgrau - Regionen mit hoher Signalintensität, entsprechen Sequenzen mit zahlreichen methylierten Cytosinen

In die Auswertung und anschließende schematische Darstellung wurden nur solche Fluoreszenzsignale einbezogen, die in mindestens der Hälfte der untersuchten Metaphasen zu finden waren.

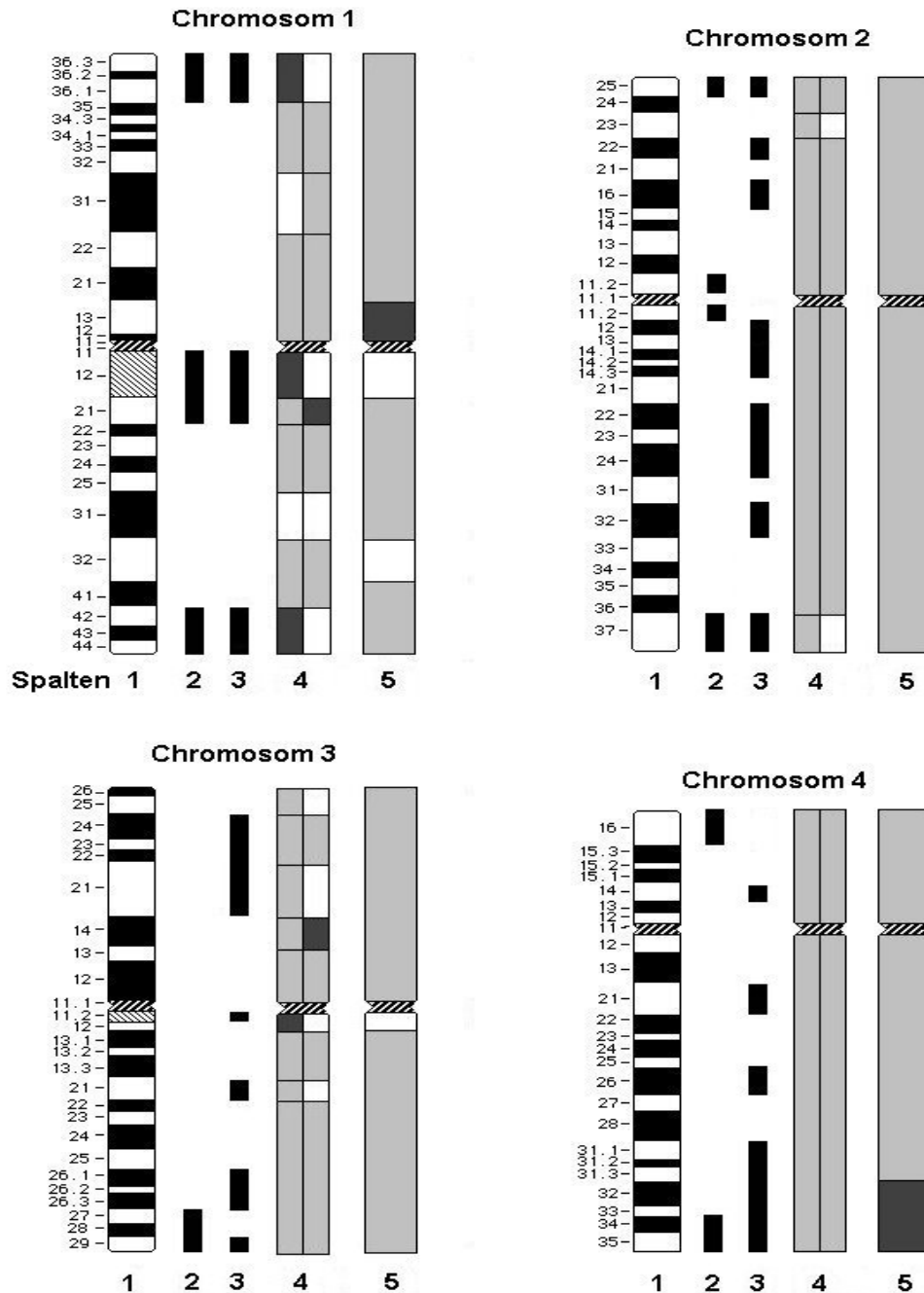
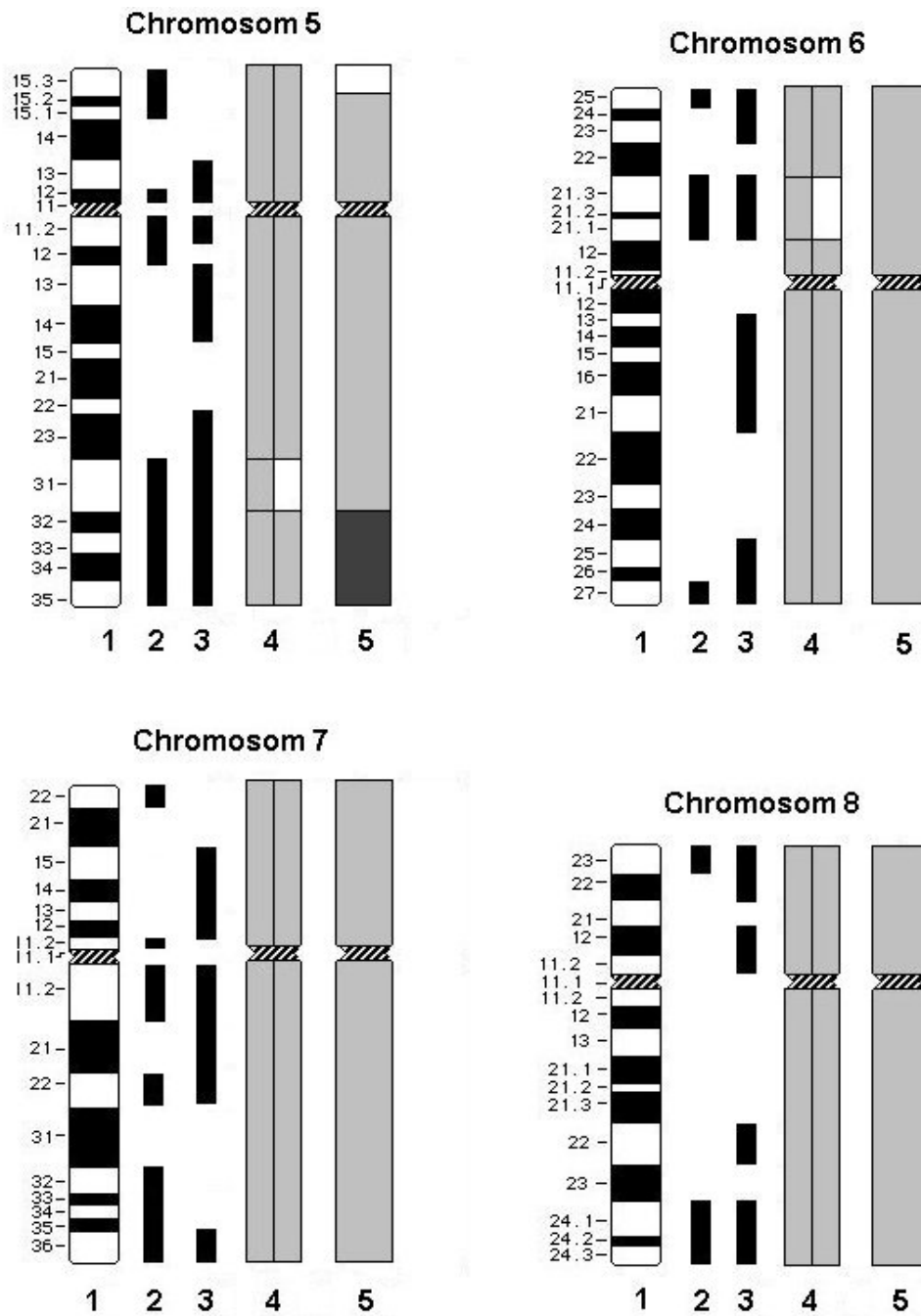
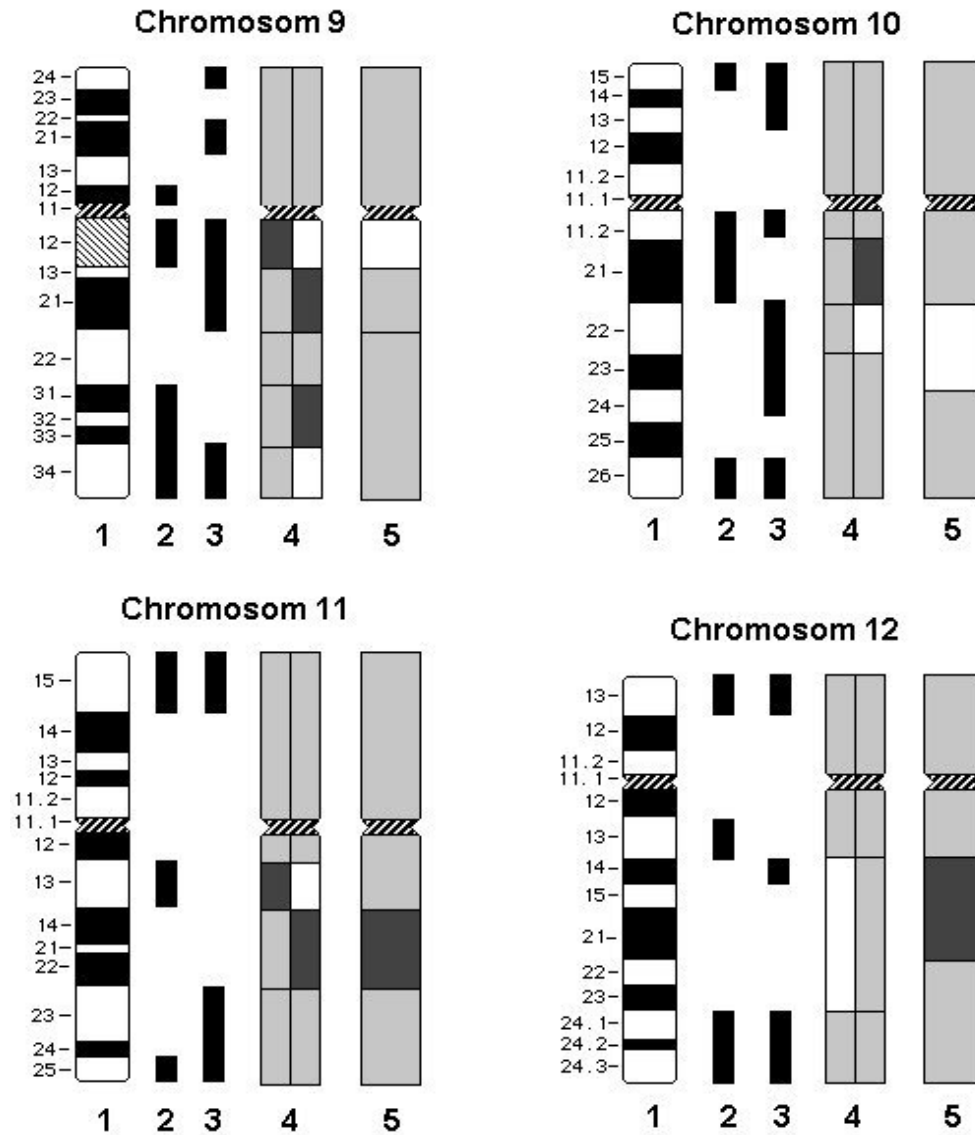


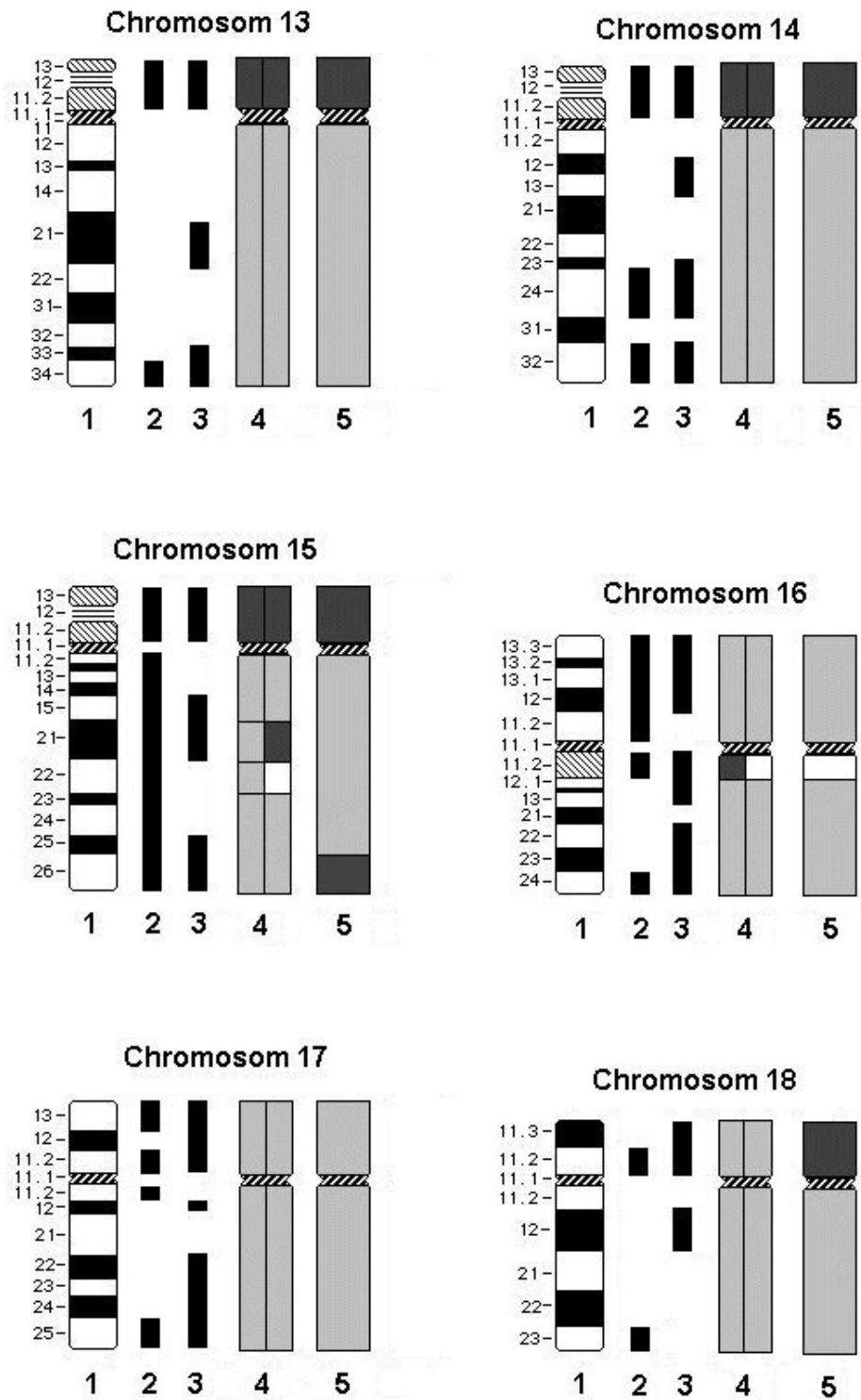
Abb. 3 Zuordnung des Fluoreszenzsignals zu Regionen der Chromosomen 1-22 sowie des X- und Y-Chromosoms. Spalte 1: Darstellung des Chromosoms in der 400-Banden-Auflösung (ISCN, 1995), Spalte 2: Bereiche, die mit einem 5-Methylcytosin-Antikörper nachgewiesen wurden (Barbin et al., 1994), Spalte 3: Sequenzen, die durch Cot1-DNA blockiert werden können (Cot-Banding, Kallioniemi et al., 1992), Spalte 4: beobachtetes Fluoreszenzsignalprofil nach der Hybridisierung mit Natriumbisulfit behandelter Normal-DNA, links: Verwendung von geringer Cot1-DNA-Menge (5 µg), rechts: Verwendung von großer Cot1-DNA-Menge (40 µg), Spalte 5: beobachtetes Fluoreszenzsignalprofil nach der Hybridisierung mit Natriumbisulfit behandelter CML-DNA. Spalte 4 und Spalte 5: weiße Felder: Regionen ohne Fluoreszenzsignal; hellgrau: Regionen mit unspezifischen Signalmustern; dunkelgrau: Regionen mit hoher Signalintensität



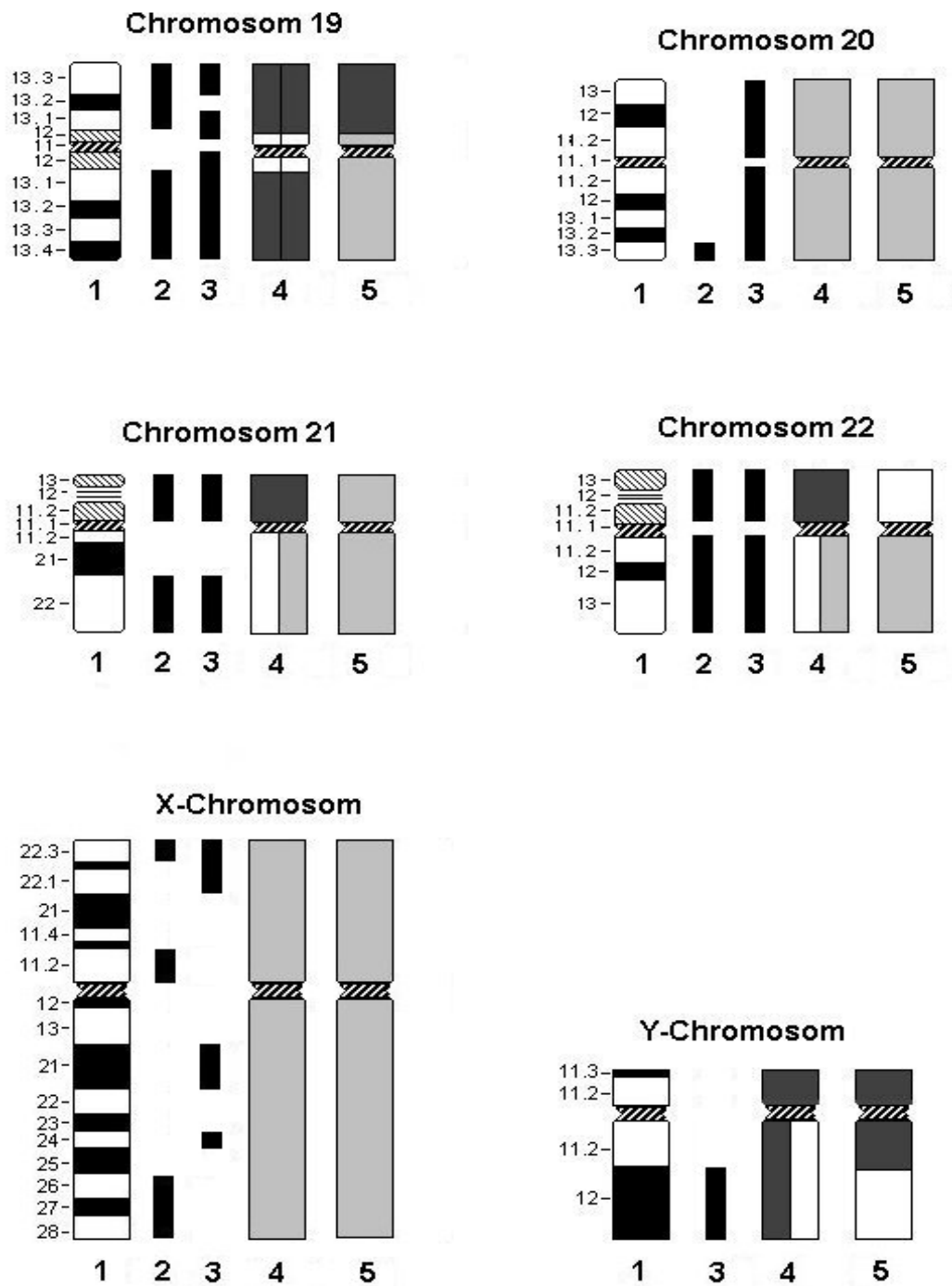
Fortsetzung Abb. 3, siehe Legende S. 54



Fortsetzung Abb. 3, siehe Legende S. 54



Fortsetzung Abb. 3, siehe Legende S. 54



Fortsetzung Abb. 3, siehe Legende S. 54

Chromosom 1 zeigte nach der Hybridisierung mit Natriumbisulfit behandelter Normal-DNA ein heterogenes Bild der Signalgebung. Bei Verwendung einer geringen Menge an Cot1-DNA (5 µg) blieb die Sequenz 1p31 ohne Signal, während ein starkes Signal in den kaum geblockten repetitiven Sequenzen 1p36.1-36.3, 1q12 und 1q42-44 beobachtet wurde (Abb. 3, Spalte 4 links). Diese Bereiche waren bei Erhöhung der Cot1-DNA-Menge auf 40 µg fast vollständig supprimiert (Abb. 3, Spalte 4 rechts). Ein Hybridisierungssignal konnte gleichzeitig in der Region 1q21 festgestellt werden. Der Bereich 1q31 zeigte stets kein Fluoreszenzsignal. Die Versuche mit CML-DNA zeigten ein starkes Signal in 1p12-13, während die Regionen 1q12 und 1q32 (Abb. 3, Spalte 5) signalarm erschienen.

Die Aufnahmen von **Chromosom 2** zeigten bei den Versuchen mit suffizienter Blockade der repetitiven Sequenzen in den Banden 2p23 und 2q37 Verluste der Signalstärke (Abb. 3, Spalte 4 links), während das gesamte Chromosom bei den Untersuchungen der Normal-DNA bei geringer Cot1-DNA-Menge (Abb. 3, Spalte 4, rechts) und nach Hybridisierung mit CML-DNA (Abb. 3, Spalte 5) keine auffällige Zunahme oder Verringerung der Intensität des Fluoreszenzsignals zeigte.

Chromosom 3 stellte sich ähnlich dem Chromosom 1 sehr heterogen dar. Die Darstellung der Versuche mit geringen Cot1-DNA-Mengen wies bis auf ein starkes Signal in 3q11.2-12 eine gleichmäßige Signalgebung (Abb. 3, Spalte 4 links). Unter Verwendung großer Cot1-DNA-Mengen dagegen war ein detaillierteres Signalprofil zu erkennen: 3p25-26, 3p21, 3q11.2-12 und 3q21 zeigten ein vermindertes Signal, die Bande 3p14 jedoch war stark gefärbt (Abb. 3, Spalte 4 rechts). Die CML-DNA war bis auf die signalarme Region 3q11.2-12 wenig aussagekräftig (Abb. 3, Spalte 5).

Die CML-DNA von **Chromosom 4** zeigte einen Bereich hoher Signalintensität in 4q32-q35 (Abb. 3, Spalte 5), andere Muster waren auf diesem Chromosom ebenso wie bei Versuchen mit Normal-DNA (Abb. 3, Spalte 4) nicht zu erkennen.

Nach der Hybridisierung der Normal-DNA auf **Chromosom 5** war im Bereich 5q31 eine Divergenz in den Signalintensitäten feststellbar. Mit ausreichender Blockade der repetitiven Sequenzen fiel die zuvor unauffällige Region 5q31 (Abb. 3, Spalte 4 links) durch die Verminderung des Fluorochromsignals auf (Abb. 3, Spalte 4 rechts). Die CML-DNA ließ eine geringe Signalintensität im Bereich 5p15.3 und eine Signalverstärkung bei 5q32-35 erkennen (Abb. 3, Spalte 5).

Chromosom 6 zeigte nach Hybridisierung mit Normal-DNA unter Verwendung einer großen Cot1-DNA-Menge in der Region 6p21.1-21.3 eine Signalverminderung (Abb. 3, Spalte 4, rechts), während die übrigen Bereiche, wie auch die CML-DNA (Abb. 3, Spalte 5), gleichmäßig gefärbt waren.

Bei den Aufnahmen der Hybridisierungen auf **Chromosom 7 und 8** konnte bei beiden DNA-Proben eine homogene Färbung der Chromosomen beobachtet werden (Abb. 3, Spalte 4, Spalte 5).

Bei **Chromosom 9** waren die p-Arme des Chromosoms nach Hybridisierung mit Normal-DNA (Abb. 3, Spalte 4) bzw. mit CML-DNA (Abb. 3, Spalte 5) bezüglich der Signalintensität unauffällig, die q-Arme des Chromosoms zeigten jedoch ein unterschiedliches Signalprofil. Ohne ausreichende Suppression der repetitiven Sequenzen war das zentromernahe Heterochromatin in 9q12 stark gefärbt (Abb. 3, Spalte 4, links), bei Erhöhung der Cot1-DNA-Menge wurde diese Region wie auch der Telomerbereich 9q34 geblockt und die Bereiche 9q13-21 und 9q31-33 traten hervor (Abb. 3, Spalte 4, rechts). Die Hybridisierung der CML-DNA erzeugte eine Signalverminderung in 9q12 (Abb. 3, Spalte 5).

Auch die p-Arme von **Chromosom 10** zeigten nach der Hybridisierung von Normal-DNA (Abb. 3, Spalte 4) bzw. von CML-DNA (Abb. 3, Spalte 5) ein homogenes Signal. Auch hier waren Divergenzen in den Signalprofilen festzustellen. Durch den Einsatz einer großen Cot1-DNA-Menge konnten die zuvor unauffälligen Regionen 10q21 (Signalzugewinn) und 10q22 (Signalverminderung) besser dargestellt werden (Abb. 3, Spalte 4). Die Banden 10q22-23 zeigten auch bei Verwendung von CML-DNA eine Abnahme der Signalintensität (Abb. 3, Spalte 5).

Chromosom 11 wies nach der Hybridisierung mit CML-DNA ein starkes Signal in 11q14-22 auf (Abb. 3, Spalte 5). In den Regionen 11q13 bis 11q22 konnte bei den Versuchen mit Normal-DNA durch eine unterschiedlich starke Blockierung repetitiver Sequenzen ein abweichendes Profil erhoben werden: 11q13 stellte sich ohne suffiziente Cot1-DNA-Menge stark gefärbt und 11q14-22 unauffällig dar (Abb. 3, Spalte 4, links), während bei Suppression von 11q13 die Region 11q14-22 durch eine Signalerhöhung auffiel (Abb. 3, Spalte 4, rechts).

Bei Verwendung einer geringen Cot1-DNA-Menge zeigte die Hybridisierung von Normal-DNA auf **Chromosom 12** eine Signalverminderung in 12q14-q23 (Abb. 3,

Spalte 4, links). Nach Hybridisierung der CML-DNA konnte ein starkes Fluoreszenzsignal in der Region 12q14-21 festgestellt werden (Abb. 3, Spalte 4).

Die akrozentrischen **Chromosomen 13, 14 und 15** wiesen ein ähnliches Signalprofil auf. Die kurzen, heterochromatischen Arme der Chromosomen waren nach Hybridisierung von Normal-DNA (Abb. 3, Spalte 4) und CML-DNA (Abb. 3, Spalte 5) jeweils stark gefärbt. Auch nach einer Erhöhung der Cot1-DNA-Menge zeigte sich dieses Bild. Nur auf dem langen Arm von **Chromosom 15** wurden Differenzen beobachtet. Die zunächst durchschnittlich gefärbten Regionen 15q21 und 15q22 (Abb. 3, Spalte 4, links) traten nach Blockade der repetitiven Sequenzen durch eine Signalvermehrung (15q21) bzw. eine Signalverminderung (15q22) deutlicher hervor (Abb. 3, Spalte 4 rechts). Bei den Versuchen mit CML-DNA zeigte sich eine hohe Signalintensität in 15q26 (Abb. 3, Spalte 5).

Außer im zentromernahen heterochromatischen Bereich 16q11.2 war **Chromosom 16** ein nach beiden Hybridisierungen homogen gefärbtes Chromosom (Abb. 3, Spalte 4, Spalte 5). In diesen Regionen der Normal-DNA konnte durch eine hohe Cot1-DNA-Menge die zuvor auffällige hohe Signalintensität geblockt werden (Abb. 3, Spalte 4). Da auch bei der Hybridisierung mit CML-DNA mit einer großen Menge an Cot1-DNA prähybridisiert wurde, stellte sich diese repetitive Region schwach gefärbt dar (Abb. 3, Spalte 5).

Chromosom 17 zeigte keine spezifischen Signalmuster.

Bei **Chromosom 18** konnten nach der Hybridisierung von Normal-DNA keine auffälligen Signalmuster beobachtet werden (Abb. 3, Spalte 4), während die CML-DNA den Bereich 18p11.2-11.3 anfärbte (Abb. 3, Spalte 5).

Auch nach Blockierung der repetitiven Sequenzen konnte auf dem gesamten **Chromosom 19**, bis auf die zentromernahen heterochromatischen Regionen 19p12 und 19q12, ein starkes Signal nachgewiesen werden (Abb. 3, Spalte 4). Die CML-DNA zeigte eine starke Färbung nur im Bereich 19p13.1-13.3 (Abb. 3, Spalte 5).

Nach der Hybridisierung von Normal-DNA und CML-DNA wurden auf **Chromosom 20** keine spezifischen Signalmuster nachgewiesen.

Bei den **Chromosomen 21 und 22** wurde eine Verminderung der Signalstärke bei Normal-DNA unter Verwendung einer geringen Cot1-DNA-Menge in den Regionen 21q11.2-22 bzw. 22q11.2-13 beobachtet (Abb. 3, Spalte 4, links). Nach der

Hybridisierung der CML-DNA auf **Chromosom 22** konnte in 22p11.2-13 eine Verminderung der Signalstärke festgestellt werden (Abb. 3, Spalte 5)

Das **X-Chromosom** zeigte keine spezifischen Signalmuster.

Nach den Hybridisierungen auf das **Y-Chromosoms** mit Normal-DNA fiel unter Verwendung einer großen Cot1-DNA-Menge ein geringes Fluoreszenzsignal in Yq11.2-12 auf, während ohne die Blockade diese Region sowie der kurze Arm des Chromosoms stark gefärbt war (Abb. 3, Spalte 4). Die CML-DNA hybridisierte ebenfalls auf dem kurzen Arm und in Yq11.2, während der distale Bereich des langen Arm dieses Chromosoms sich ohne Signalgebung darstellte (Abb. 3, Spalte 5).

6.2.2 Comparative Genomic Hybridization

Da die Ergebnisse der FISH durch visuelle Auswertung der chromosomalen Fluoreszenzsignale ermittelt wurden, sollten diese durch quantitative Messung der Signalintensitäten mittels Comparative Genomic Hybridization (CGH) objektiviert werden. Die Vorbereitung der Metaphasechromosomen sowie der DNA-Proben erfolgte auf gleiche Weise wie bei FISH. Die Referenz-DNA wurde jeweils mit Streptavidin-FITC (grün) und die Test-DNA mit Anti-Digoxigenin-Rhodamin (rot) detektiert.

Abb. 4 und Abb. 5 zeigen die von der CGH-Auswertungssoftware berechneten Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten entlang aller Chromosomen dargestellt. Es wurde zunächst Natriumbisulfit behandelte Normal-DNA (Test-DNA) zusammen mit unbehandelter Normal-DNA (Referenz-DNA) hybridisiert (Abb. 4). Anschließend erfolgte der Vergleich zwischen CML-DNA (Test-DNA) und Normal-DNA, nachdem beide mit Natriumbisulfit behandelt wurden (Abb. 5). Die Mittellinie bezeichnet das Verhältnis zwischen beiden Fluorochromen von 1,0, d.h. beide liegen in gleicher Intensität an dieser Stelle des Chromosoms vor. Die senkrechte grüne und rote Linie entsprechen den Schwellenwerten der Fluoreszenzintensitäten, die bei 0,85 (grün) und 1,15 (rot) festgelegt wurden. Wird eine Unterschreitung des unteren Schwellenwertes durch einen grünen Balken angezeigt, bedeutet dies eine niedrigere Bindungsaffinität zwischen rot detektierter Test-DNA und der Ziel-DNA auf dem Objektträger. Die grüne Signalintensität überwiegt dann. Ist die Bindungsaffinität

der grün markierten Referenz-DNA geringer, wird ein roter Balken entsprechend einem Überschreiten des Verhältnisschwellenwertes über 1,15 dargestellt. Ist kein farbiger Balken zu sehen, besteht eine ausgeglichene Bindungskapazität beider DNA-Proben in diesem Bereich.

6.2.2.1 CGH mit Natriumbisulfit behandelter Normal-DNA

Zunächst wurde Natriumbisulfit behandelte Normal-DNA (Test-DNA) zusammen mit unbehandelter Normal-DNA (Referenz-DNA) hybridisiert (Abb. 4). Beide stammen von der gleichen Versuchsperson mit XX-Chromosomensatz.

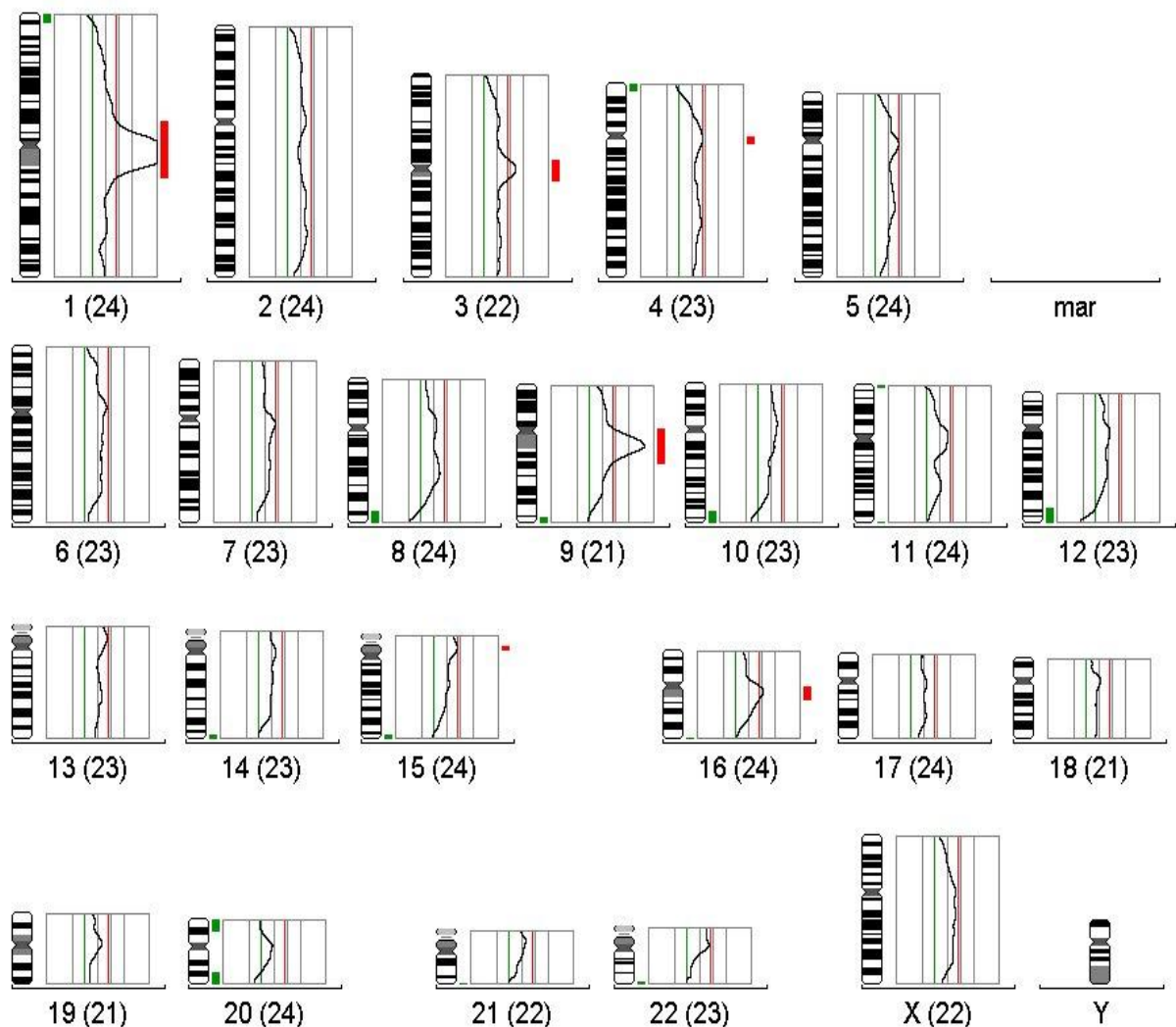


Abb. 4 Fluoreszenzintensitätsprofile nach CGH mit unbehandelter Normal-DNA (grün markiert) und Natriumbisulfit behandelter Normal-DNA (rot markiert)

Bereiche mit einer höheren Bindungskapazität der Referenz-DNA, erkennbar an einem grünen Balken neben den entsprechenden chromosomalen Regionen, konnten hauptsächlich in den Telomerregionen der Chromosomen 1, 4, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 20 und 22 nachgewiesen werden (1p36.3, 4p16, 8q24.2-24.3, 9q34.3, 10q26, 12q24.2-24.3, 14q32.3, 15q26.3, 20p13, 20q13.2-13.3, 22q13.3). Die zentromernahen Regionen der Chromosomen 1, 3, 4, 9, 15 und 16 zeigten ein Überwiegen des roten Fluorochroms (1p11-13.3, 1q11-21, 3q11, 4p11, 9q11-21.1, 15p, 16q11).

6.2.2.2 CGH mit Natriumbisulfit behandelter Normal-DNA und CML-DNA

Bei diesem Versuch erfolgte die Hybridisierung von Normal-DNA (Referenz-DNA, grün markiert) und CML-DNA (Test-DNA, rot markiert), nachdem beide mit Natriumbisulfit behandelt wurden. Auch hier tragen beide DNA-Proben einen XX-Chromosomensatz. Abb. 5 zeigt das von der Auswertungssoftware errechnete Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten in jedem Chromosom.

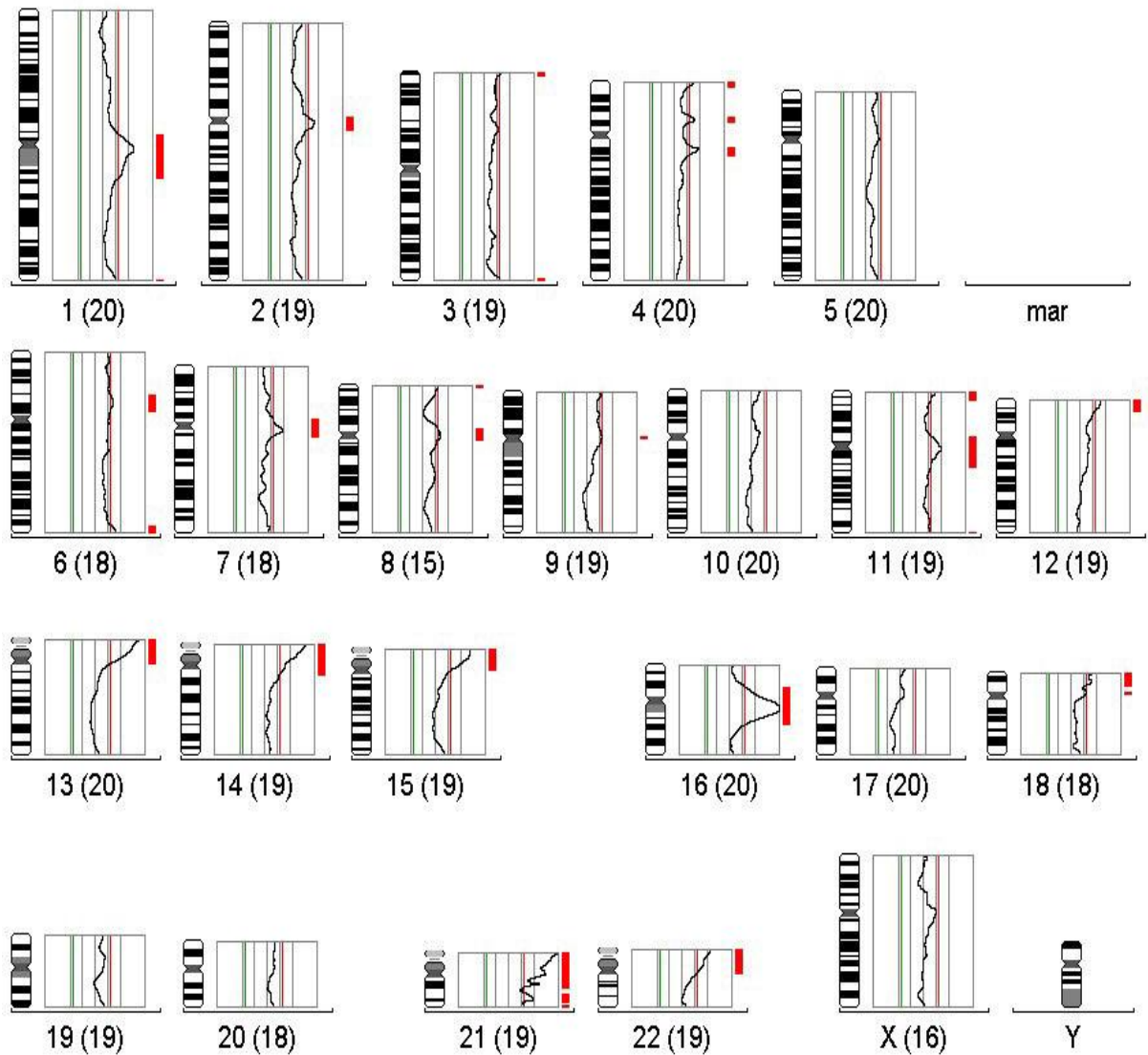


Abb. 5 Fluoreszenzintensitätsprofile nach CGH mit Natriumbisulfit behandelter Normal-DNA (grün markiert) und Natriumbisulfit behandelter CML-DNA (rot markiert)

Die folgenden Regionen zeigten eine hohe Intensität der roten markierten, mit Natriumbisulfit behandelten CML-DNA: die Zentromerregionen der Chromosomen 1, 2, 7, 8, 9, 11, 16, 21, die Telomerregionen der Chromosomen 3, 4, 6, 8, 11, 12, die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21, 22 sowie die Regionen 4p14, 4q13, 6p12-21.1, 18p und 21q22.

6.2.3 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von Tumorzelllinien

Die Hybridisierung genomischer DNA der Tumorzelllinie Colo 320 erfolgte vor und nach Behandlung mit Natriumbisulfit auf native Metaphasen derselben Zelllinien. Abb. 6 und Abb. 7 zeigen die Aufnahmen der hybridisierten Zelllinie Colo 320. Die bei dieser Zelllinie bekannten numerischen und strukturellen chromosomalen Abweichungen (Chromosomenzahl zwischen 38 und 96 und die homogen gefärbten Regionen (homogeneously stained regions, HSR, (Quinn et al., 1979) konnten auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Die HSR stellen sich als besonders signalintensive grüne Bereiche dar, welche als einzelne Banden auf den Chromosomen sichtbar waren oder das ganze Chromosom bedeckten. Die Fluoreszenzintensitäten dieser HSR, die aufgrund der vielfältigen Morphologie der Zelllinien-Metaphasen nicht eindeutig auf bestimmte Chromosomen lokalisiert werden konnten, unterschieden sich nicht in den Aufnahmen vor und nach Behandlung mit Natriumbisulfit. Ein relativ großes Chromosom, das komplett mit HSR bedeckt war, konnte auf den meisten der ausgewerteten Metaphasen beobachtet werden. Dies entsprach wahrscheinlich dem von Alitalo und Mitarbeiter sowie von Erisman und Mitarbeiter beschriebenen abgewandelten X-Chromosom, welches durch Transposition des *c-myc*-Gens von 8q24 und dessen Amplifikation entstanden ist (Alitalo et al., 1983; Erisman et al., 1988; 5.1.1).

Die übrigen Chromosomen waren kaum gefärbt. Auch Aufnahmen unter Aussparung der HSR, um deren große Signalstärke auszublenden, zeigten keine nachweisbare Färbung der anderen Bereiche der Metaphase.

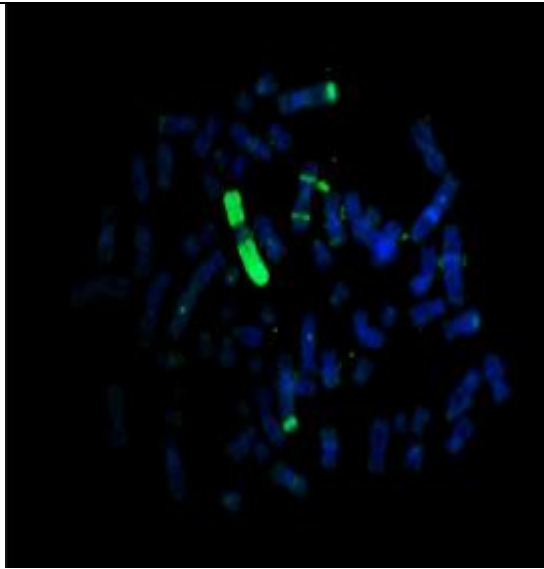


Abb. 6 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung der genomischen DNA der Zelllinie Colo 320 (grün markiert) auf native Metaphasen dieser Zelllinie vor der Behandlung mit Natriumbisulfit. Die hier dargestellte Metaphase entspricht nicht der in Abb.7.

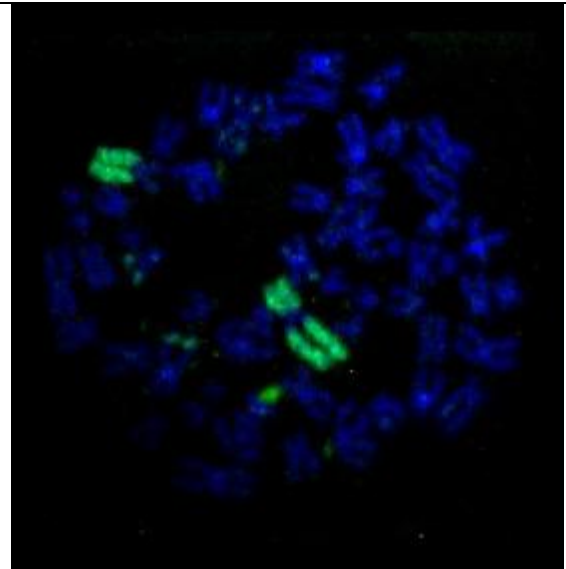


Abb. 7 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung der genomischen DNA der Zelllinie Colo 320 (grün markiert) auf native Metaphasen dieser Zelllinie nach der Behandlung mit Natriumbisulfit

6.3 Natriumbisulfitreaktion auf Metaphasechromosomen

Ziel dieses Versuches war die Etablierung der direkten Natriumbisulfitreaktion auf Metaphasechromosomen der zu untersuchenden gesamtgenomischen DNA. Nach der Natriumbisulfitreaktion erfolgte die Hybridisierung mit markierten unbehandelten DNA-Sonden zum Nachweis der methylierten Regionen sowie einer Standardsonde (wcp#1) zur Kontrolle der Hybridisierungsreaktion (siehe 5.3). Theoretisch würde die Sonden-DNA nur an methylierte Bereiche binden, da nur diese durch die Natriumbisulfitreaktion nicht in ihrer Sequenz verändert wurden. Nach der Hybridisierung konnten keine Metaphasechromosomen auf den Objektträgern gefunden werden. Nur in den Interphasekernen, die auf den Objektträgern verteilt sind, wurden zwei intensive Fluoreszenzsignale detektiert, welche am ehesten der wcp-Sonde #1 entsprach.

Es erfolgten insgesamt 202 Natriumbisulfitreaktionen und 150 MSP. In den FISH-Versuchen konnten 20 Metaphasen der DNA aus Normalsuspension, 20 Metaphasen der CML-DNA, 25 CGH-Karyogramme und 5 Metaphasen mit Zelllinien-DNA ausgewertet werden.

7 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, methylierte chromosomale Regionen mittels Natriumbisulfitreaktion und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zu beschreiben und zu lokalisieren. Die Natriumbisulfitreaktion konvertiert unmethylierte Cytosine in Uracile, während die methylierten Basen unverändert bleiben und in der darauf folgenden FISH nachweisbare Hybridisierungen mit der Ziel-DNA eingehen können. Durch die Detektion der hybridisierten DNA mit Fluorochromen werden die methylierten Bereiche durch den Nachweis eines Fluoreszenzsignals sichtbar.

7.1 Molekulargenetische Methoden

7.1.1 Natriumbisulfitreaktion und methylspezifische Polymerasekettenreaktion

Die Natriumbisulfitreaktion stellt ein in der Molekulargenetik etabliertes Verfahren zur Detektion methylierter Basen dar (Frommer et al., 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde das von Clark und Mitarbeiter 1994 weiterentwickelte Verfahren verwendet, welches eine Reaktionszeit von 16 Stunden bei einer Temperatur von 55°C vorsah. Grunau et al. untersuchten 2001 den Einfluß von variierten Versuchsparametern auf die Vollständigkeit der Umsetzung und die resultierende DNA-Menge. Sie gaben als optimal eine Reaktionszeit von 4-18 Stunden bei einer Temperatur von 55°C oder eine Stunde bei 95°C an. Diese Variablen wurden in der vorliegenden Arbeit getestet, um das für das vorgesehene Verfahren optimale Protokoll zu finden. Die methylspezifische Polymerasekettenreaktion (MSP, Herman et al., 1996) wurde mit einem Teil der DNA-Probe nach der Natriumbisulfitreaktion durchgeführt, um die Vollständigkeit der Konversion kontrollieren zu können. Es wurden *p16*-Primer verwendet, welche so gestaltet sind, daß sie die Sequenz des Tumorsuppressorgens *p16* amplifizieren, wenn diese entweder nur unmethylierte oder nur methylierte Cytosine enthielt. Ein anderer *p16*-Primer amplifizierte nur die Originalsequenz. So konnte einerseits eine Aussage über den Methylierungsstatus der Sequenz von *p16*-Sequenz in der untersuchten DNA-Probe, als auch über die Vollständigkeit der Konversion getroffen werden. Die Längen der PCR-Produkte der verschiedenen Primer differierten, sodaß eine genaue Identifikation in der anschließenden Gelelektrophorese möglich war. Die Natriumbisulfit behandelten DNA-Proben wurden

nur für die FISH verwendet, wenn nach der MSP eine eindeutige Aussage über den Methylierungsstatus der Sequenz *p16* in diesen Proben möglich war. Dies war der Fall, wenn die Gelelektrophorese nur ein PCR-Produkt pro DNA-Probe zeigte, also entweder eine Amplifikation des *p16*-Primers für unmethylierte Cytosine oder des *p16*-Primers für methylierte Cytosine (siehe Abb. 1). Waren zwei oder drei PCR-Produkte einer DNA-Probe sichtbar, wurde diese verworfen.

Nach 4 Stunden Reaktionszeit zeigte die Messung der DNA-Konzentration einen geringen DNA-Verlust, nach der MSP konnte jedoch kein eindeutiges Ergebnis der Natriumbisulfitreaktion dargestellt werden. Diese Temperatur schont die DNA-Struktur, die kurze Reaktionszeit reicht aber nicht für eine vollständige Konversion der DNA aus. Nach einer Stunde bei 95°C war nur eine geringe DNA-Menge messbar, am ehesten verursacht durch Degeneration der DNA durch die hohe Temperatur (Grunau et al., 2001). Die größten DNA-Konzentration bei eindeutigem Nachweis der erfolgreichen Umsetzung unmethylierter Basen wurden nach 16 Stunden Reaktionszeit bei einer Temperatur von 55°C erzielt. Unter diesen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen vollständiger Konversion der unmethylierten Cytosine und der Degradierung der DNA. Durch die Sequenzierung von Natriumbisulfit umgesetzter DNA konnte die unter diesen Reaktionsbedingungen vollständig erhaltene DNA-Struktur nachgewiesen werden (Clark et al., 1994).

Bei allen eingesetzten gesamtgenomischen DNA-Proben (aus Normal-Suspension, von CML-Patienten und aus der Tumorzelllinie) konnten Natriumbisulfitreaktionen mit vollständiger Konversion und methylspezifische Polymerasekettenreaktionen mit eindeutigem Ergebnis durchgeführt werden.

7.2 Molekularzytogenetische Methoden

7.2.1 Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Nach den Hybridisierungen mit gesamtgenomischer DNA aus kultivierten Lymphozyten gesunder Probanden (Referenz-DNA) und von Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie (Test-DNA) wurden zunächst die Intensitäten des Fluoreszenzsignals zwischen Chromosomen derselben Metaphase sowie zwischen homologen Chromosomen für jeweils beide DNA-Proben verglichen. Außerdem

erfolgte die Zuordnung des Fluorochromprofils zum Bandenmuster eines jeden Chromosoms.

7.2.1.1 Intensitätsvergleich von chromosomalen Fluoreszenzsignalen

In Tabelle 19 sind die chromosomalen Signalstärken nach Hybridisierung von Normal-DNA und CML-DNA aufgeführt.

In den Versuchen mit Normal-DNA zeigten die Chromosomen 3, 9, 10, 11, 21 und Y eine starke Fluoreszenzfärbung, während sie bei Verwendung der CML-DNA kaum gefärbt waren. Ein Grund hierfür könnte die globale Demethylierung im Tumorgenom sein, die vor allem die zahlreichen parasitären und repetitiven Sequenzen in diesen Chromosomen betrifft (siehe Einleitung 1.2.2, Barbin et al., 1994). Neben diesen genannten konnte auch bei den Chromosomen 16 und 22, die zahlreiche repetitive DNA-Elemente enthalten, in der CML-DNA eine geringe Signalintensität festgestellt werden. Umgekehrt verhielten sich die Chromosomen 4 und 18. Sie waren nach Hybridisierung der CML-DNA stark gefärbt, zeigten aber bei Verwendung der Normal-DNA nur eine geringe Signalstärke. Entsprechend des oben genannten Versuchsansatzes konnte die hohe Intensität des Fluoreszenzsignals mit einer vermehrten Anzahl von methylierten Cytosinen auf diesen Chromosomen des Tumorgenoms gleichgesetzt werden. Bisher konnte in verschiedenen Studien nur lokale Hypermethylierungen in Promotoren einzelner Gene nachgewiesen werden (siehe 3.2; Jones and Laird, 1999; Baylin und Herman, 2000), eine globale Erhöhung des Methylierungslevels wurde bis jetzt nicht beobachtet.

7.2.1.2 Zuordnung des Fluoreszenzsignals zu chromosomalen Regionen

1. Nach Hybridisierung von Sonden-DNA aus Normalsuspension

Die Aufnahmen nach der Hybridisierung mit Natriumbisulfit behandelter Normal-DNA (Referenz-DNA) zeigten eine nicht zufällige Verteilung von Fluoreszenzsignalen auf den Chromosomen (Abb. 3). Da nur Sequenzen mit methylierten Cytosinen durch die Natriumbisulfitreaktion unverändert bleiben, können diese vollständig mit der Ziel-DNA hybridisieren und nach der Detektion als Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden.

Die schematische Darstellung der Ergebnisse nach Hybridisierung von Normal-DNA (Abb. 3, Spalte 4) ist je nach verwendeter Menge an Cot1-DNA im Vergleich zur eingesetzten Sonden-DNA-Konzentration in eine linke (geringe Cot1-DNA-Menge, 5 µg) und eine rechte Spalte (große Cot1-DNA-Menge, 40 µg) unterteilt.

Barbin et al. konnten 1994 mit Hilfe eines Antikörpers gegen 5-Methylcytosin methylierte chromosomale Bereiche nachweisen, die in vier Typen eingeteilt wurden. In Tabelle 21 sind diese 4 Typen sowie die in der vorliegenden Arbeit gefundenen methylierten Regionen, unabhängig von der verwendeten Menge an Cot1-DNA, gegenübergestellt.

Tabelle 21 Methylierte Regionen nach Barbin et al., 1994 und nach Hybridisierung von gesamtgenomischer Sonden-DNA aus Normalsuspension

methylierte Regionen nach Barbin et al., 1994	methylierte Regionen nach Hybridisierung von gesamtgenomischer Sonden-DNA aus Normalsuspension
<u>Typ I</u> zentromernahe Heterochomatinregionen 1q12, 9q12, 16q11.2 , das distale Segment von Yq12 , juxtazentromeren Segmente 2p11.2, 2q11.2, 7p11.2, 7q11.2, 10p11.2, 10q11.2, 17p11.2, 17q11.2	1q12, 3q11.2-12, 9q12, 16q11.2 und Yq12 , Yq11.2
<u>Typ II</u> telomernahe und einige interkalare Banden (T-Banden) 1p36, 1q21, 1q42, 1q44 , 2p25, 2q37, 3q27, 3q29, 4p16, 4q35, 5p15, 5q31, 5q35, 6p25, 6p21, 6q27, 7p22, 7q22, 7q34, 7q36, 8p23, 8q24, 9q34, 9q22, 10p15, 10q26, 11p15, 11q13 , 11q25, 12p13, 12q13, 12q24, 13q34, 14q24, 14q32, 16p13, 16q24, 17p13, 17q25, 18p11.2, 18q23, 19p13, 19q13 , 20q13.3, 21q22, 22q11.2, 22q13, Xp22.3, Xp11.2, Xq28	1p36, 1q21, 1q42-44, 11q13, 11q14-22, 19p13, 19q13

<u>Typ III</u> schwach gefärbte R-Banden, die auf beiden homologen Chromosomen identisch waren, 5p12, 5q11.2-12, 5q32, 5q34	
<u>Typ IV</u> kurze Arme der akrozentrischen Chromosomen 13p, 14p, 15p, 21p, 22p 15q	13p, 14p, 15p, 21p, 22p <u>übrige</u> 3p14, 9q21, 9q31-33, 10q21 und 11q14-22

Gegenüberstellung der von Baylin et al., 1994 und der nach Hybridisierung von gesamtgenomischer Sonden-DNA aus Normalsuspension in der vorliegenden Arbeit gefundenen methylierten Regionen; fett hervorgehoben sind die chromosomalen Bereiche, die in beiden Arbeiten übereinstimmen

Die Regionen vom Typ I enthalten klassische Satelliten-DNA und ribosomale DNA mit stark kondensiertem, transkriptionell inaktivem Chromatin, welches in somatischen Zellen normalerweise stark methyliert ist (Miniou et al., 1994; Robertson und Wolffe, 2000, Costello und Plass, 2001). Diese Bereiche sowie die Region 3q11.2-12 wurden in der vorliegenden Arbeit aufgrund ihres intensiven Fluoreszenzsignals als methylierte Regionen nachgewiesen. Die als Typ II bezeichneten T-Banden stellen eine Untergruppe der Giemsa-negativen R-Banden dar. Sie sind GC-reich und enthalten einen großen Teil der Gene (Holmquist, 1992; Saccone et al., 1992), von denen die Hälfte in den Promotorbereichen CpG-Inseln mit unmethylierten Cytosinen besitzt (siehe 3.2; Antequera und Bird, 1993; Baylin, 1997, Robertson und Jones, 2000). Unter Verwendung von Restriktionsenzymen konnten unmethylierte CpG-Dinukleotide in T-Banden nachgewiesen werden, welche wahrscheinlich den genassoziierten unmethylierten CpG-Inseln entsprechen (Adolph und Hameister, 1990; Craig und Bickmore, 1994). Die Ergebnisse von Barbin et al. 1994 zeigten aber auch methylierte CpG-Dinukleotide in diesen Bereichen, ebenso wie in den als Typ III bezeichneten R-Banden. Diese Resultate entstanden durch methylierte *Alu*-Sequenzen in diesen chromosomalen Regionen (Miniou et al., 1994). *Alu*-Sequenzen gehören zu den SINES (short interspersed elements), den im Genom verteilten repetitiven Sequenzen, die 40% des Genoms ausmachen und die durch Methylierung blockiert werden. Weiterhin sind in diesen Banden vorhandene gewebespezifische Gene ohne CpG-Inseln oft methyliert (siehe 3.2, Robertson und

Wolffe, 2000). In Tabelle 21 sind die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen methylierten T-Banden aufgeführt. Die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen, die individuelle Polymorphismen und einen variablen Gehalt an repetitiver DNA zeigen, wurden als Typ IV beschrieben. Starke Fluoreszenzsignale entstehen aufgrund des Gehaltes an methylierter Satelliten-DNA und ribosomaler DNA in diesen Bereichen (Brock et al., 1999; Robertson und Wolffe, 2000). Die Hybridisierungen beider X-Chromosomen einer Metaphase zeigten bei Baylin et al. 1994 und in der vorliegenden Arbeit keinen Unterschied im Methylierungsmuster. Auch in anderen Studien konnten keine stark methylierten Bereiche auf dem methylierten genomisch geprägtem (inaktivem) X-Chromosom identifiziert werden (Bernardino et al., 1996; Brock et al., 1999). Es wurde spekuliert, daß die Differenzen zwischen dem früh replizierenden, aktiven, X und dem spät replizierenden inaktiven X-Chromosom bei nicht synchronisierten Metaphasen nicht detektierbar ist und der durchschnittliche Methylierungsgehalt beider Chromosomen ähnlich ist (Brock et al., 1999).

In der Arbeit von Brock et al., 1999 wurden methylreiche DNA-Sequenzen durch ihre Affinität an eine Methyl-CpG-bindende Säule selektiert und anschließend auf Metaphasen hybridisiert. Auch sie fanden methylierte Bereiche in den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22, in der Zentromerregion von Chromosom 9 und in den Telomerregionen zahlreicher Chromosomen. In den Telomerregionen an den Chromosomenenden wurden zuvor GC-reiche Sequenzen und Mikrosatelliten nachgewiesen (Holmquist, 1989; Royle et al., 1990), die in DNA aus Blutproben stark methyliert sind.

Die Ergebnisse nach Hybridisierung von Normal-DNA (Abb. 3, Spalte 4) wurden weiterhin mit dem Cot1-DNA-Banding nach Wang et al., 1995 (Abb. 3, Spalte 3) verglichen. Cot1-DNA besteht aus hoch-repetitiven DNA-Sequenzen und dient der Supprimierung von Hybridisierungssignalen durch Blockade dieser Sequenzen im Probenmaterial. Das Cot1-DNA-Banding, welches die Verteilung von Cot1-DNA-Sequenzen und damit der repetitiven Bereiche im Genom zeigt, ähnelt dem R-Banding. Die chromosomalen R-Banden bestehen demzufolge aus genreichen Sequenzen und aus repetitiven DNA-Elementen.

Zunächst wurde nur eine geringe Menge an Cot1-DNA (5 µg) im Vergleich zur eingesetzten Sonden-DNA-Konzentration verwendet, um die Hybridisierung in den

repetitiven Bereichen beurteilen zu können. Würde ohne Cot1-DNA hybridisiert werden, wäre das gesamte genomische Signal zu hoch (Brock et al., 1999) und eine Differenzierung von Signalstärken zwischen einzelnen chromosomalen Regionen wäre kaum möglich. Die Ergebnisse dieser Hybridisierung sind in Abb. 3, Spalte 4 links dargestellt. Bereiche, die nach Cot1-Banding und in der vorliegenden Arbeit starke Hybridisierungssignale zeigten, lagen vor allem in zentromernahen heterochromatischen Regionen der Chromosomen 1, 3, 9, 13, 14, 15, 16, 19, 21 und 22 sowie an den Telomerenden von Chromosom 1 vor.

Anschließend wurde mit einer großen Cot1-DNA-Menge (40 µg) prähybridisiert, um das starke Fluoreszenzsignal dieser repetitiven Regionen zu supprimieren, damit auch andere genomische Regionen hinsichtlich ihres Methylierungsgrades beurteilt werden können. Die blockierten repetitiven Sequenzen sind in Abb. 3, Spalte 4 durch ihr fehlendes Fluoreszenzsignal auf den Chromosomen zu erkennen. Durch diese Blockade zeigten die Regionen 1q21, 3p14, 9q21, 9q31-33, 10q21, 11q14-22, 15q21 eine hohe Intensität des Fluoreszenzsignals (Abb. 3, Spalte 4 rechts). Der Bereich 1q21 entspricht einer T-Bande und damit dem Typ II in Tabelle 21.

Die methylierten Regionen 3p14, 9q21, 9q31-33, 10q21 und 11q14-22 stellen außer 9q32 und 11q21 G-positive Banden dar (ISCN, 1995) welche relativ genarm sind und methylierte CpG-Dinukleotide enthalten. Zusammenfassend wird deutlich, daß besonders lange, methylreiche DNA-Sequenzen mit der hier angewandten Methode identifiziert werden können.

Der Vergleich zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und denen von Baylin et al., 1994 und Brock et al., 1999 zeigt, daß mit der hier angewandten Methode der Natriumbisulfitreaktion und FISH nicht alle methylierten Bereichen der anderen Studien nachgewiesen werden konnten. Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung war Bestandteil aller drei Studien und wurde ähnlich durchgeführt. Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Anwendung der Natriumbisulfitreaktion zum Nachweis methylierter Regionen sein. Baylin et al. nutzten 5-Methylcytosin-Antikörper, welche genau mit den methylierten Cytosinen reagieren und mittels Fluoreszenzdetektion ermittelt werden konnten. Bei Brock et al. wurden methylierte DNA-Sequenzen aus Blutproben mittels einer Methyl-CpG-bindenden Säule selektiert, markiert und nach der Hybridisierung detektiert. Die Methode der Natriumbisulfitreaktion dagegen beruht auf Sequenzunterschieden

zwischen methylierten und unmethylierten Bereichen, die durch die Konversion der unmethylierten Cytosine in Uracil entstehen. In langen DNA-Sequenzen mit zahlreichen Methylgruppen besteht eine höhere Homologie zwischen der Test-DNA und der Ziel-DNA auf den Metaphaseplatten, so daß einzelne Fehlpaarungen durch unmethylierte Cytosine die Hybridisierung wahrscheinlich nicht beeinträchtigen und die Bindung beider DNA-Proben durch die Posthybridisierungswaschungen nicht wieder getrennt werden. In Regionen mit einer geringeren Zahl methylierter Cytosine können diese durch die geringe Homologie der gesamten Sequenz und damit der geringen Bindungsstärke nicht detektiert werden. Auch die noch zu geringe Auflösung der Aufnahmemikroskope, welche Signalunterschiede aufgrund von Fehlpaarungen nicht erkennen läßt, könnte eine Ursache für diese Ergebnisunterschiede sein.

2. Nach Hybridisierung von CML-DNA

Die gesamtgenomische DNA eines Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie wies nach den FISH-Hybridisierungen ein differentes Signalprofil zur Normal-DNA auf (Abb. 3, Spalte 5). Es wurde immer eine große Konzentration an Cot1-DNA (40 µg) verwendet, da in den ersten Hybridisierungen mit geringen Mengen das genomische Signal so stark war, daß keine Signalunterschiede zwischen chromosomalen Regionen zu erkennen waren. Diese Gleichförmigkeit des Signalprofils zeigt, daß die repetitiven Sequenzen in diesen Proben nicht demethyliert wurden, wie dies häufig in Tumorgenomen vorkommt (Robertson und Wolffe, 2000). Nach der Blockade dieser Sequenzen erschienen, wie erwartet, die heterochromatischen Bereiche 1q12, 3q11.2-12, 9q12, 16q11.2, 22p und Yq12 mit einer geringen Intensität des Fluoreszenzsignals. Die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15 und 21 färbten sich jedoch auch dann in den meisten der untersuchten Metaphasen stark an. Dies könnte darauf schließen, daß in diesen Regionen andere repetitive Elemente vorhanden waren, die nicht mit denen in der Cot1-DNA übereinstimmen und deshalb nicht blockiert werden (Wang et al., 1995). In den Bereichen 1q32, 5p15.3 und 10q22-23 konnte kein Fluoreszenzsignal nach Hybridisierung der Tumor-DNA (Abb. 3, Spalte 5) gemessen werden. Diese chromosomalen Regionen zeigten in den Versuchen mit Normal-DNA

keine Auffälligkeiten im Signalprofil, so daß das fehlende Signal auf eine tumorspezifische Demethylierung hinweisen könnte. Eine Erhöhung der Signalintensität wurde außer in kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15 und 21 (s.o.) auch in 1p11-13, 4q32-35, 5q32-35, 11q14-22, 12q14-21, 15q26, 19p13.1-13.3 und Yq11.2 gefunden. Einige dieser Regionen sind telomernahe Regionen am Ende der Chromosomen, die wahrscheinlich dem Typ II nach Baylin et al., 1994 entsprechen und durch ihren Anteil an GC-reichen Sequenzen und Mikrosatelliten stark methyliert sind (Brock et al., 1999).

7.2.2 Comparative Genomic Hybridization

Nach den ersten Ergebnissen mit FISH, welche durch subjektive Beurteilung der chromosomalen Signalstärken ermittelt wurden, sollten diese mittels Comparative Genomic Hybridization (vergleichende Genomhybridisierung, CGH) objektiviert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese molekularzytogenetische Methode verwendet, um durch kompetitive Hybridisierung die Bindungsaffinitäten von zwei unterschiedlich markierten gesamtgenomischen Sequenzen, der Test-DNA und der Referenz-DNA, auf allen Chromosomen vergleichen zu können (siehe 3.5.2). In der vorliegenden Arbeit wurde die Test-DNA jeweils rot und die Referenz-DNA grün markiert. Die CGH-Auswertungssoftware errechnet nach Aufnahme der absoluten Fluorochromintensitäten das Verhältnis der beiden Fluorochrome entlang der Chromosomen. Die Referenz-DNA stellt dabei einen internen Standard dar, anhand dessen Verluste, Zugewinne oder Amplifikationen der Test-DNA gemessen werden können. Da die Signalintensität an einer bestimmten Stelle auf dem Chromosom von der Bindungsaffinität der DNA abhängig ist, wird eine Unterrepräsentation der Test-DNA durch eine höhere grüne Farbintensität und eine höhere Bindungsstärke durch eine größere rote Farbintensität auf den Metaphasechromosomen sichtbar. In der graphischen Auswertung wird dies durch einen grünen bzw. roten Balken an entsprechender Stelle dargestellt.

Die absoluten Signalintensitäten sind abhängig von der Qualität der Metaphase, der Effektivität von DNA-Markierung und Hybridisierung, der Empfindlichkeit der Kamera und der Belichtungszeit (Piper et al., 1995).

In der Vorbereitung der CGH werden die gleichen molekularzytogenetischen Methoden angewandt, die bereits bei der FISH verwendet wurden, um die Varianz zwischen den Methoden so gering wie möglich zu halten.

7.2.2.1 CGH mit Natriumbisulfit behandelter DNA aus Normalsuspension

In Abb. 4 sind die Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten zwischen Natriumbisulfit behandelter gesamtgenomischer Sonden-DNA (Test-DNA, rot) und unbehandelter Sonden-DNA (Referenz-DNA, grün), beide aus Normalsuspension, dargestellt. Die Telomerregionen der Chromosomen 1, 4, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 20 und 22 (1p36.3, 4p16, 8q24.2-24.3, 9q34.3, 10q26, 12q24.2-24.3, 14q32.3, 15q26.3, 20p13, 20q13.2-13.3, 22q13.3; Abb.6) zeigten eine höhere Intensität des grünen Fluorochroms, entsprechend einer höheren Bindungsstärke der unbehandelten Normal-DNA. Die Unterrepräsentation der Test-DNA entsteht durch die zuvor durchgeführte Natriumbisulfitreaktion, welche unmethylierte Cytosine in Uracile konvertiert, so daß eine Hybridisierung nicht mehr möglich ist. Daraus resultiert die niedrigere Bindungsaffinität der rot markierten Test-DNA an dieser Stelle und das Überwiegen des grünen Fluorochroms. In den genreichen Telomerregionen der Chromosomen wurden unmethylierte Cytosine mit Hilfe von Restriktionsenzymen nachgewiesen (Adolph und Hameister, 1990; Craig und Bickmore, 1994). Sie befinden sich dort vor allem in den CpG-Inseln am Anfang der Genpromotoren (siehe Einleitung 1.2). Die in den FISH-Experimenten dargestellten unmethylierten chromosomalen Bereiche 1p31, 1q31, 12q14-23, 21q11-22 und 22q11-13 (Abb. 3) konnten aber mit CGH nicht reproduziert werden. Und während die CGH-Ergebnisse auf unmethylierte Cytosine in den Telomerregionen schließen lassen, wurden die starken Hybridisierungssignale bei FISH in diesen Bereichen als Nachweis von methylierten Sequenzen interpretiert. Kallioniemi und Mitarbeiter, die Erstbeschreiber der CGH-Methode, beobachteten in den Telomerbereichen eine generelle Abnahme der Fluoreszenzintensität der Test-DNA. Diese Regionen sollten daher vorsichtig beurteilt werden (Kallioniemi et al. 1994).

Die in Abb. 4 dargestellten roten Balken weisen auf eine höhere Bindungsstärke der rot markierten Test-DNA in diesen chromosomalen Bereichen hin. Dies sind hauptsächlich die zentromernahen Regionen der Chromosomen 1, 3, 4, 9, 15 und 16

(1p11-13.3, 1q11-21, 3q11, 4p11, 9q11-21.1, 15p, 16q11), die durch einen hohen Anteil an methylierten repetitiven DNA-Sequenzen charakterisiert sind. Weiterhin könnte eine ungenügende Blockade mit Cot1-DNA die Ursache für die hohe Intensität des roten Fluorochroms sein.

Liegt an einer Stelle des Chromosoms das Verhältnis des roten und grünen Fluorochroms innerhalb der Schwellenwerte, besteht bei Test-DNA und Referenz-DNA die gleiche Bindungsaffinität des chromosomalen Materials. Ein farbiger Balken wird dann nicht angezeigt. Dies ist der Fall, wenn in einer Sequenz die identische Anzahl methylierter oder unmethylierter Cytosine in beiden DNA-Proben vorhanden ist. Eine Differenzierung ist dann mit CGH nicht möglich.

7.2.2.2 CGH mit Natriumbisulfit behandelter DNA aus Normalsuspension und CML-DNA

Bei diesem Versuch erfolgte die Hybridisierung von Normal-DNA (Referenz-DNA, grün) und CML-DNA (Test-DNA, rot), nachdem beide mit Natriumbisulfit behandelt wurden. Auch hier tragen beide DNA-Proben einen XX-Chromosomensatz. Abb. 5 zeigt die von der Auswertungssoftware errechneten Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten auf jedem Chromosom.

Die folgenden Bereiche zeigten ein Überwiegen des roten Fluorochroms, entsprechend einer höheren Bindungsstärke der CML-DNA: die Zentromerregionen der Chromosomen 1, 2, 7, 8, 9, 11, 16, die Telomerregionen der Chromosomen 3p, 4p, 6q, 8p, 11p, 12p, die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21, 22 sowie die Regionen 4p14, 4q13, 6p12-21.1, 18p und 21q22 (Abb.7).

Ausgehend vom bereits beschriebenen Versuchsansatz enthalten diese chromosomalen Regionen der CML-DNA zahlreiche methylierte Cytosine. Die in der Referenz-DNA dort vorhandenen unmethylierten Cytosine sind in Uracil konvertiert worden. Eine Hybridisierung ist damit nicht mehr möglich. Die Überrepräsentation der CML-DNA könnte aber auch durch Amplifikationen des genetischen Materials verursacht sein, welche bisher bei der Untersuchung von CML-Proben in unterschiedlichen chromosomalen Regionen gefunden wurden. Sie erstreckten sich hauptsächlich auf komplette Arme der Chromosomen oder auf das ganze Chromosom, und wurden zum Teil nur in den Proben eines Patienten gefunden

(Gribble et al. 1999, Su et al. 1999). Sie könnten patientenspezifische und nicht tumorspezifische Veränderungen sein. Ob die amplifizierte DNA methylierte oder unmethylierte Cytosine enthält, kann dabei nicht eindeutig beurteilt werden, denn bei einer sehr hohen Bindungsstärke der DNA ist davon auszugehen, daß einzelne Fehlpaarungen die Hybridisierung nicht beeinträchtigen.

Der Vergleich mit den bei FISH nachgewiesenen methylierten Bereichen im CML-Genom zeigte eine Übereinstimmung in folgenden chromosomalen Regionen: der Zentromerbereich von Chromosom 1 (1p11-13), die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15 sowie der kurze Arm des Chromosoms 19 (Abb. 3, Abb. 5). In CML-Proben wurden bis jetzt keine Änderungen des Methylierungsstatus dieser Regionen beschrieben, welche polymorphe repetitive, methylierte DNA-Elemente enthalten.

Auffallend bei der Auswertung der CGH ist der vorwiegende Profilverlauf im roten Signalbereich. Eine allgemeine höhere Farbintensität des Fluorochroms Rhodamin konnte ausgeschlossen werden, da bei der CGH mit gegensätzlich markierter Referenz-DNA (rot) und Test-DNA (grün) die Intensität des grünen Signals deutlich höher war. Die wahrscheinlichste Ursache ist eine ungenügende Suppression der repetitiven DNA-Sequenzen. Grüne Balken in der graphischen Darstellung der CGH (Abb. 5), welche einen relativen Überschuß an Normal-DNA aufgrund von Demethylierungen im Tumorgenom darstellen würden, wurden nicht gefunden.

In den chromosomalen Regionen, in denen sich das Verhältnis der beiden Fluorochrome innerhalb der Schwellenwerte bewegte, wurde kein farbiger Balken angezeigt und auf den Chromosomen war eine Mischfarbe sichtbar. Dann lag in beiden DNA-Proben die identische Menge methylierter oder unmethylierter Cytosine vor.

Die beschriebenen Unterschiede in den Ergebnissen zeigen, daß mit FISH und CGH differente Signalstärken in gleichen chromosomalen Regionen beobachtet wurden. In den Telomerregionen wurden mit FISH methylierte Sequenzen nachgewiesen, während die CGH-Versuche unter Berücksichtigung der methodischen Einschränkungen (Kallioniemi et al. 1994, S. 79) auf unmethylierte Cytosine in diesen Bereichen schließen lassen. Ein Vergleich mit der Literatur ergab ähnlich kontroverse Ergebnisse hinsichtlich des Methylierungsgehaltes dieser Regionen. So wiesen Adolph und Hameister sowie Craig und Bickmore unmethylierte Cytosine in

Telomerregionen nach, während Barbin et al. Hinweise für methylierte Basen entdeckte (Adolph und Hameister 1990; Craig und Bickmore, 1994; Barbin et al. 1994). In die Interpretation der Ergebnisse sollten außerdem Überlegungen über die Möglichkeiten und Grenzen der CGH mit einfließen. So können Deletionen, die unmethylierten Bereichen entsprechen, erst ab einer Größe von 10-20 Mb nachgewiesen werden (Kallioniemi et al., 1994). In methylierten CpG-Inseln finden sich aber durchschnittlich alle 10 Basenpaare (bp) ein methyliertes Cytosin (5-me-C), während in der Masse der DNA methylierte CpG-Dinukleotide nur alle 100-150 bp ein 5-me-C haben (Brock et al., 1999). Es kann nicht sicher beurteilt werden, inwieweit die Konversion der unmethylierten Cytosine in Uracile und damit einzelbasige Paarungen die Hybridisierung ermöglichen.

7.2.3 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von Tumorzelllinien

Die Hybridisierungen der Tumorzelllinie Colo 320 erzeugten vor und nach der Behandlung mit Natriumbisulfit ähnliche Bilder (**Abb.6** und **Abb.7**). Auffällig war die starke Signalgebung der homogen gefärbten Regionen (homogeneously stained regions, HSR), die entweder in einzelnen Banden oder auf kompletten Chromosomenarmen sichtbar waren. Eines dieser vollständig aus HSR bestehenden Chromosomen konnte auf den meisten Metaphasen beobachtet werden und entsprach wahrscheinlich einem abgewandeltem X-Chromosom, dessen HSR aus amplifizierten *c-myc*-Sequenzen bestehen (siehe 5.1.1). Entsprechend des bereits beschriebenen Versuchsansatzes entsteht eine hohe Fluoreszenzintensität in der hybridisierten DNA durch das Vorhandensein methylierter Cytosine. Da sie durch die Behandlung mit Natriumbisulfit nicht in ihrer Sequenz verändert wurden, hybridisierten diese Bereiche anschließend in gleichem Ausmaß. Oft enthalten die HSR vielfach amplifizierte DNA-Sequenzen, so daß das hohe Fluoreszenzsignal aufgrund der zahlreichen Einzelkopien in diesen genomischen Bereichen entstanden sein kann. Dies würde auch die signalstarke Hybridisierung der HSR vor der Behandlung mit Natriumbisulfit erklären.

Große Teile des Zellliniengenoms zeigten vor und nach Behandlung mit Natriumbisulfit nur geringe bis keine Fluoreszenzintensitäten und auch unter Aussparung der intensiv gefärbten Bereiche bei der Aufnahme konnten keine Signale

in anderen Teilen der Metaphase detektiert werden. Eine Aussage bezüglich des Methylierungsgrades dieser Regionen ist daher nicht möglich. Bekannt ist aber, daß das Ausmaß der genomweiten Demethylierungen in Tumorzelllinien ähnlich dem in Tumorzellen ist und bis zu 47% betragen kann (Singal und Ginder, 1999; Esteller et al., 2001).

7.2.3.1 Ergebnisse der Varianz der Reaktionsparameter

1. Markierung der genomischen DNA-Sonden

Um die gesamtgenomischen DNA-Sonden für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zu markieren, boten sich zwei standardisierte Verfahren an. Die Nick-Translation ermöglicht die schnelle Markierung der DNA-Sonden ohne Amplifikation und ohne Änderung der Ausgangssequenz. Aufgrund dieser Eigenschaft waren jedoch große Mengen (1-7 µg) an Natriumbisulfit umgesetzter DNA notwendig, um die für eine erfolgreiche Hybridisierung nötige Anzahl an Sequenzkopien zu erreichen. Bei dem hier angewandten Protokoll waren 10-20 Ansätze für die Natriumbisulfitreaktion nötig. Aus diesem Grund wurde die DOP-PCR mit degenerierten Nukleotidprimern gewählt, um durch die gleichzeitig durchgeführte Amplifikation aus einer geringen Ausgangskonzentration eine ausreichende Menge an markierter Sonden-DNA gewinnen zu können. Im Vergleich beider Methoden war jedoch kein Unterschied in den Ergebnissen der Hybridisierung nachweisbar.

2. Prähybridisierung

Durch die Verwendung unterschiedlicher Mengen an Cot1-DNA (5 µg, 40 µg) im Vergleich zur eingesetzten Sonden-DNA-Konzentration kann das Ausmaß an Blockierung repetitiver Sequenzen variiert werden. Mit einer großen Cot1-DNA-Menge (40 µg) konnten Einzelkopiesequenzen besser dargestellt werden, deren Signal sonst durch das Signal der ungeblockten repetitiven Bereiche überdeckt wurde. Bei Einsatz einer geringen Cot1-DNA-Menge (5 µg) wurden die ungeblockten repetitiven Sequenzen v.a. im Heterochromatin und in den Telomeren dargestellt. Allerdings können Homoduplices zwischen Sonden-DNA und Ziel-DNA sowie Kreuzhybridisierungen nicht vermieden werden. Die Auswertung dieser Signale ist schwierig.

3. Posthybridisierungswaschungen

Eine andere Möglichkeit, auf die Spezifität des Hybridisierungsergebnisses Einfluß zu nehmen, ist die Änderung der Stringenz bei den Posthybridisierungswaschungen. Stringentere Bedingungen, die durch Temperaturerhöhung und eine Senkung der Ionenkonzentration in der Waschlösung bewirkt werden, erleichtern das Abdissoziieren fehlgepaarter Hybride und erhöhen so die Spezifität. Bei komplexen DNA-Sonden, wie hier verwendet, verringert das Maß der Fehlpaarungen die Stabilität gegenüber Temperaturerhöhungen, denn ein Prozent an Fehlpaarungen senkt die Schmelztemperatur um 1 °C (Strachan und Read 1996a).

Zunächst wurde mit wenig stringenten Bedingungen gearbeitet (siehe 5.2.4, Protokoll 1), um die Hybridisierungsqualität der DNA-Sonden nach der Natriumbisulfitreaktion beurteilen zu können. Da nach dieser Reaktion die methylierten Bereiche der DNA-Sonden aufgrund ihrer identischen Basenabfolge komplementäre Hybride mit der Ziel-DNA auf den Metaphaseplatten bildeten und in unmethylierten Regionen Basenkonversionen (C → U) entstanden sind, wurde anschließend mit hoch stringenten Bedingungen versucht, die fehlgepaarten DNA-Stränge abzulösen und nur wirklich komplementäre Strangbildungen (in methylierten Bereichen) darzustellen (siehe 5.2.4, Protokolle 2, 3).

Die Stabilität der methylierten Bereiche verstärkt sich durch den hohen GC-Gehalt und die entsprechend größere Bindungsstärke durch die zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung und die resultierende höhere Schmelztemperatur. In den unmethylierten Bereichen ist durch die C → U – Konversionen der GC-Gehalt niedriger und die nicht komplementären Stränge werden leichter wieder getrennt (Strachan und Read, 1996c).

7.3 Natriumbisulfitreaktion von Metaphasechromosomen

Mit dieser Methode wurde versucht, eine schnellere Möglichkeit zum Nachweis von methylierten Cytosinen in Genomen zu finden. Weil die Natriumbisulfitreaktion an den Metaphasechromosomen auf den Objektträgern erfolgt, sind die methylspezifische PCR sowie die nachfolgende Reinigungs- und Markierungsprozedur mit der Test-DNA nicht notwendig. Auf den Aufnahmen nach

der Hybridisierung konnten jedoch keine chromosomalen Strukturen identifiziert werden. Diese wurden durch die Natriumbisulfitreaktion so stark zerstört, daß eine Hybridisierung nicht mehr möglich war. Auffallend waren zwei intensive Signale in Interphasekernen auf denselben Objekträgern, die wahrscheinlich der Sonde wcp#1 entsprachen, welche zur Kontrolle der Hybridisierung verwendet wurde und an Chromosom 1 bindet. Die Chromosomen in Interphasekernen sind durch protektive Strukturen geschützt, so daß sie durch die Natriumbisulfitreaktion einer geringeren Zerstörung ausgesetzt sind.

8 Schlußfolgerungen

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Verfahrens zur Analyse methylierter chromosomaler Bereiche. Durch die Kombination von Natriumbisulfitreaktion und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) konnten reproduzierbare Muster von methylierten Regionen im Genom gesunder Probanden beschrieben werden. Diese waren auch unter Verwendung von 5-Methylcytosin-Antikörpern (Barbin et al., 1994) und methylbindenden Säulen (Brock et al., 1999) nachweisbar. Mit der anschließenden Comparative Genomic Hybridisation (CGH) gelang teilweise die objektive Bestätigung der mit FISH erzielten Ergebnisse.

Besonders Sequenzen mit einer hohen Zahl an methylierten Cytosinen konnten eindeutig nachgewiesen werden. Die Bewertung von Regionen mit nur einer geringen Methylierungsfrequenz sollte zurückhaltend erfolgen, denn es ist noch unklar, inwieweit einzelbasige Fehlpaarungen Einfluß auf die Hybridisierung einer bestimmten genomischen Sequenz haben.

Der Vergleich von gesamtgenomischer DNA gesunder Probanden und von Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie zeigte eine unterschiedliche Verteilung von methylierten Bereichen in beiden Genomen. Die Beurteilung der Signaldifferenzen ist und bleibt schwierig.

Bei der Untersuchung genomischer DNA der Tumorzelllinie aus einem Kolonkarzinom wurden die bereits von Quinn und Mitarbeiter beschriebenen HSR (homogeneously stained regions, homogen gefärbte Regionen) nachgewiesen, welche vor und nach Behandlung mit Natriumbisulfit auch unter Verwendung keine Änderung der Signalintensität zeigten und somit keine Aussage über deren Methylierungsgehalt ermöglichten.

Bei der Durchführung der direkten Natriumbisulfitreaktion auf Metaphasechromosomen wurde eine erhebliche Destruktion der chromosomalen Strukturen beobachtet, so daß der Methylierungsgrad des Genoms nicht beurteilt werden konnte.

Nach weiteren Optimierungen der methylspezifischen Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung könnte dieses Verfahren eine vielversprechende Methode zur Untersuchung spezifischer methylierter chromosomaler Regionen zur Charakterisierung zahlreicher Erkrankungen sein.

9 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Adolph S und Hameister H (1990) In situ nick translation of human metaphase chromosomes with the restriction enzymes *MspI* and *HpaII* reveals an R-band pattern. *Cytogenet Cell Genet* 54:132-136
2. Alitalo K, Schwab M, Lin CC, Varmus HE und Bishop JM (1983) Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (*c-myc*) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:1707-1711
3. Amir RE, van den Veyer IB, Wan M, Tran CQ, Francke U und Zoghbi HY (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23:185-188
4. Antequera F und Bird A (1993) Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11995-11999
5. Attwood JT, Yung RL und Richardson BC (2001) DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci* 59:241-257
6. Avery OT, MacLeod CM und McCarthy M (1944) Studies on chemical nature of substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Biol Med* 79:137-158
7. Barbin A, Montpellier C, Kokalj-Vokac N, Gibaud A, Niveleau A, Malfoy B, Dutrillaux B und Bourgeois CA (1994) New sites of methylcytosine-rich DNA detected on metaphase chromosomes. *Hum Genet* 94:684-692
8. Baylin SB (1997) DNA methylation: Tying all together: epigenetics, genetics, cell cycle and cancer. *Science* 277:1948-1949
9. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K und Herman JG (2001) Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 10:687-692
10. Baylin SB und Herman JG (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 16:168-174

11. Belinsky SA, Nikula KJ, Baylin SB und Issa JP (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93:4045-4050
12. Bender CM, Zingg JM und Jones PA (1997) DNA methylation as a target for drug design. Pharm Res 15:175-187
13. Beranek DT, Weis CC und Swenson DH (1980) A comprehensive quantitative analysis of methylated and unmethylated DNA using high pressure liquid chromatography. Carcinogenesis 1:595-606
14. Bernardino J, Lamoliatte E, Lombard M, Niveleau A, Malfroy b, Dutrillaux B und Bourgeois CA (1996) DNA methylation of the X chromosomes of the human female: an in situ semi-quantitative analysis. Chromosoma 104:528-535
15. Bird A (1992) The essentials of DNA methylation. Cell 70:5-8
16. Buddecke E (1989) Grundriß der Biochemie. Walter de Gruyter, Berlin, New York. S. 443
17. Brock GJR, Charlton J und Bird A (1999) Densely methylated sequences that are preferentially localized at telomere-proximal regions of human chromosomes. Gene 240:269-277
18. Brown WR, MacKinnon PJ, Villasante A, Spurr N, Buckle VJ und Dobson MJ (1990) Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. Cell 63:119-132
19. Caspersson T, Faber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U und Zech L (1968) Chemical differentiation along metaphase chromosomes. Expl Cell Res 49:219-222
20. Chen RZ, Petterson U, Beard C, Jackson-Grusby L und Jaenisch R (1998) DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. Nature 395:89-93
21. Clark SJ, Harrison J, Paul CL und Frommer M (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. Nucl Acids Res 22:2990-2997
22. Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW und Helling RB (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 70:3240-3244

23. Costello JF und Plass C (2001) Methylation matters. *J Med Genet* 38:285-303
24. Craig JM und Bickmore WA (1994) The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes. *Nature Genet* 7:376-382
25. de Almeida-Toledo LF, Viegas-Pequignot E, Coutinho-Barbosa AC, Foresti F, Niveleau A und de Almeida-Toledo-Filho S (1998) Localisation of 5-methylcytosine in metaphase chromosomes of diploid and triploid pacu fish, *Piaractus mesopotamicus* (Pisces, Characiformes). *Cytogenet Cell Genet* 83:21-24
26. du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P und Cremer T (1993) Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridisation. *Hum Genet* 90:590-610
27. Erisman MD, Scott JK, Watt RA und Astrin SM (1988) The *c-myc* protein is constitutively expressed at elevated levels in colorectal carcinoma cell lines. *Oncogene* 2:367-378
28. Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH und Herman JG (1998) MLH1 promotor hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene* 17:2413-2417
29. Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin AK, Trojan J, Vaurs-Barrière C, Bignon YJ, Ramus S et al. (2001) DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 10:3001-3007
30. Esteller M und Herman JG (2002) Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 196:1-7
31. Fang JY, Zhu SS, Xiao SD, Jiang SJ, Shi Y, Chen XY, Zhou XM und Qian IF (1996) Studies on the hypomethylation of *c-myc*, *c-Ha-ras* oncogenes and histopathological changes in human gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 11:1079-1082
32. Feinberg AP und Vogelstein B (1983) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301:89-92

33. Feinberg AP, Gehrke CW, Kuo KC und Ehrlich M (1988) Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res* 48:1159-1161
34. Feinberg AP (2001) Cancer epigenetics takes center stage. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:392-394
35. Ford CE, Jones KW und Polani PE, Almeida JCDE und Briggs JH (1959): A sex-chromosomal anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1:711-713
36. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collins CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL und Paul CL (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1827-1833
37. Frühwald MC und Plass C (2002) Global and gene-specific methylation patterns in cancer: aspects of tumor biology and clinical potential. *Mol Genet Metab* 75:1-16
38. Gerhard DS, Kawasaki ES, Bancroft FC und Szabo P (1981) Localization of a unique gene by direct hybridization in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3755-3759
39. Gray JW und Collins C (2000) Genome changes and gene expression in human solid tumors. *Carcinogenesis* 21:443-452
40. Gribble SM, Sinclair PB, Grace C, Green AR und Nacheva EP (1999) Comparative analysis of G-banding, chromosome painting, locus-specific fluorescence in situ hybridization, and comparative genomic hybridization in chronic myeloid leukemia blast crisis. *Cancer Genet Cytogenet* 111:7-17
41. Grunau C, Clark SJ und Rosenthal A (2001) Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucl Acids Res* 29:65-72
42. Hagberg B, Aicardi J, Dias K und Ramos O (1983) A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. *Ann Neurol* 14:471-479

43. Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemas CM und Gartler SM (1999) The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14412-14417
44. Harper ME und Saunders GF (1981) Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma* 83:431-439
45. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD und Baylin SB (1996) Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9821-9826
46. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JKV, Hamilton SR, Kinzler KW et al. (1998) Incidence and functional consequences of hMLH1 promotor hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:6870-6875
47. Hermann R und Drings P: *Innere Medizin*. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, 9. Auflage 1998, S. 1001
48. Hliscs R, Mühlig P und Claussen U (1997) The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes. *Cytogenet and Cell Genet* 76 (3-4):167-171
49. Holmquist GP (1989) Evolution of chromosome bands: molecular ecology of noncoding DNA. *J Mol Evol* 28:469-486
50. Holmquist GP (1992) Chromosome Bands, their chromatin flavours and their functional features. *Am J Hum Genet* 51:17-37
51. Hotchkiss RD (1948) The quantitative separation of purines, pyrimidines and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem* 175: 315-332
52. ISCN, An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Mitelman F (ed) (1995). S. Karger Verlag, Basel
53. Jeanpierre M, Turleau C, Aurias A, Prieur M, Ledeist F, Fischer A und Viegas-Pequignot E (1993) An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. *Hum Mol Genet* 2:731-735

54. Jones PA und Laird PW (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21:163-167
55. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman FM und Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821
56. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW und Pinkel D (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosome Cancer* 10:231-243
57. Kuchino Y, Hanyu N und Nishimura S (1987) Analysis of modified nucleosides and nucleotide sequences of tRNA. *Methods Enzymol* 155:379-396
58. Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson SL, Jung WE, Li E, Weinberg RA und Jaenisch R (1995) Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 81:197-205
59. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921
60. Lejeune J, Gantier M und Turpin R (1959) Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *Compt Rend* 248:1721-1722
61. Lengauer C, Kinzler KW und Vogelstein B (1997) DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2545-2550
62. Malcolm S, Barton P, Murphy C und Ferguson-Smith MA (1981) Chromosomal localization of a single copy gene by in situ hybridization – beta-globulin genes on the short arm of chromosome 11. *Ann Hum Genet* 45:135-141
63. Maraschio P, Zuffardi O, Dalla Fior T und Tiepolo L (1988) Immundeficiency, centromeric heterochromatin instability of chromosome 1, 9 and 16, and facial anomalies: the ICF syndrome. *J Med Genet* 25:173-180
64. Markl ID, Cheng J, Liang G, Shibata D, Laird PW und Jones PA (2001) Global and gene-specific epigenetic patterns in human bladder cancer genomes are relatively stable *in vivo* and *in vitro* over time. *Cancer Res* 61:5875-5884

65. Mills KI, Guinn BA, Walsh VA und Burnett AK (1996) Increasing methylation of the calcitonin gene during disease progression in sequential samples from CML patients. *Leuk Res* 20:771-775
66. Miniou J, Jeanpierre M, Blanquet V, Sibella V, Bonneau D, Herbelin C, Fischer A, Nivelau A und Viegas-Pèquignot E (1994) Abnormal methylation pattern in constitutive and facultative (X inactive chromosome) heterochromatin of ICF patients. *Hum Mol Genet* 3:2093-2102
67. Nederlof PM, van de Flier S, Wiegant J, Raap AK, Taale HJ, Ploem JS und van der Ploeg M (1990) Multiple fluorescence in situ hybridization. *Cytometry* 13:839-845
68. Nguyen TT, Mohrbacher AF, Tsai YC, Groffen J, Heisterkamp N, Nichols PW, Yu MC, Lübbert M und Jones PA (2000) Quantitative measure of c-abl and p15 methylation in chronic myelogenous leukemia: biological implications. *Blood* 95:2990-2992
69. Nowell PC und Hungerford DA (1960) A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 132:1497
70. Okano M, Bell DW, Haber DA und Li W (1999) DNA methyltransferases *Dnmt3a* and *Dnmt3b* are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell* 99:247-257
71. Pinkel D, Straume T und Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(9):2934-2938
72. Piper J, Rutovitz D, Sudar D, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman FM, Gray JW und Pinkel D (1995) Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19:10-26
73. Plass C und Soloway PD (2002) DNA methylation, imprinting and cancer. *Eur J Hum Genet* 10:6-16
74. Quinn LA, Moore GE, Morgan RT und Woods LK (1979) Cell lines from human colon carcinoma with unusual cell products, double minutes, and homogeneously stained regions. *Cancer Res* 39:4914-4924

75. Robertson KD und Jones PA (2000) DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 21:461-467
76. Robertson KD und Wolffe AP (2000) DNA methylation in health and disease. *Nature Rev Genet* 1:11-19
77. Ronne M, Andersen O und Erlandsen M (1979) Effect of colcemid exposure and methanol acetic acid fixation on human metaphase chromosome structure. *Hereditas (Sweden)* 90(2):195-201
78. Rowley JD (1973) A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243:290-293
79. Royle NJ, Clarkson RE, Wong Z und Jeffreys AJ (1988) Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of human autosomes. *Genomics* 3:352-360
80. Saccone S, de Sario A, Valle GD und Bernardi G (1992) The highest gene concentration in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4913-4917
81. Saccone S, Caccio S, Kusada J, Andreozzi L und Bernardi G (1996) Identification of the gene-richest bands in human chromosomes. *Gene* 174:85-94
82. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Hon GT, Erlich HA und Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354
83. Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D et al. (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273:494-497
84. Seabright M (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971-972
85. Sharrard RM, Royds JA, Rogers S und Shorthouse AJ (1992) Patterns of methylation of the c-myc gene in human colorectal cancer progression. *Br J Cancer* 65:667-672

86. Sill H, Goldman JM und Cross NC (1995) Homozygous deletions of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukemia. *Blood* 85:2013-2016
87. Singal R und Ginder GD (1999) DNA methylation. *Blood* 93:4059-4070
88. Strachan T und Read AP: Molekulare Humangenetik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1996) S.140-142 (a), S.137 (b), S.138-141 (c), S. 485 (d), S.66 (e)
89. Su X-Y, Wong N, Cao Q, Yu LZ, Niu C, Wickham N, Johnson PJ, Chen Z und Chen S-J (1999) Chromosomal aberrations during progression of chronic myeloid leukemia identified by cytogenetic and molecular cytogenetic tools: Implication of 1q12-21. *Cancer Genet Cytogenet* 108:6-12
90. Telenius H, Pelmeur AH, Tunnacliffe A, Carter NP, Behmel A, Ferguson-Smith MA, Nordenskjöld M, Pfragner R und Ponder BAJ (1992) Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chrom Cancer* 4:257-263
91. Tjio JH und Levan A (1956) The chromosome number of man. *Hereditas* 42:1-6
92. Toyota M und Issa JP (1999) CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol* 9:349-357
93. Tycko B (1994) Genomic imprinting: mechanism and role in human pathology. *Am J Pathol* 144:431-443
94. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351
95. Wang Y, Minoshima S und Shimizu N (1995) Cot-1 banding of human chromosomes using fluorescence *in situ* hybridization with CY3 labeling. *Jpn J Human Genet* 40:243-252
96. Watson JD und Crick FHC (1953) Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:37-738

97. Wilson WD, Tanious FA, Barton HJ, Jones RL, Fox K, Wydra RL und Streckowski L (1990) DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry* 29(36):8452-8461
98. Xu GL, Bestor TH, Bouchis D, Hsieh L, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ und Viegas-Pequinognot E (1999) Chromosomal instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 402: 187-191
99. Zion M, Ben Yehuda D, Avraham A, Cohen O, Wetzler M, Melloul D und Ben Neriah Y (1994) Progressive de novo methylation at the *bcr-abl* locus in the course of chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10722-10726

10 Anhang

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Uwe Claussen danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Humangenetik und Anthropologie Jena, für sein stetes Interesse an meiner Arbeit, wertvolle wissenschaftliche Diskussionen sowie für die Begutachtung der Dissertation.

Herrn PD Dr. Ferdinand von Eggeling danke ich für seine engagierte Betreuung und Unterstützung. Ohne seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft, die zahlreichen praktischen Hinweise und Ratschläge wäre die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen. Weiterhin danke ich für die Durchsicht der Manuskripte.

Herrn Dr. Thomas Liehr danke ich für die fachlichen Anregungen zur Durchführung und Auswertung der Molekularzytogenetischen Methoden.

Herrn Dr. Ivan Loncarevic danke ich für die Überlassung der CML-Proben.

Frau Dr. Anita Heller und Dr. Angela Nietzel danke ich für die unermüdliche Hilfe beim Erlernen und Durchführen der molekulargenetischen Verfahren, viele wichtige fachliche Anregungen und ihre stete wissenschaftliche Diskussionsbereitschaft.

Frau Susanne Michel danke ich für die Hilfe bei der Kultivierung der Lymphozyten sowie der Arbeit an der Zelllinienkultur.

Bei allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik und Anthropologie Jena möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die vielen fachlichen und nichtfachlichen Gespräche bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Den Gutachtern danke ich für die Beurteilung der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Stephan Patt danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit sowie die zahlreichen wertvollen Hinweise zur Erarbeitung des Manuskriptes sowie für die Durchsicht desselben.

Meinem Bruder Dirk danke ich für die Hilfe bei der Arbeit am Computer.

Und Karina Martienssen danke ich für alles.

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Name	Antje Kaiser
Anschrift	Dr.- Wilhelm-Külz-Str. 21 08060 Zwickau
Geburtsdatum	21. April 1978
Geburtsort	Zwickau

Schul Ausbildung

1984 - 1991	Pestalozzi-Gesamtschule Zwickau
1991 - 1992	Pestalozzi-Gymnasium Zwickau
1996	Abitur

Studium

10/1996 – 12/2003	Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
24. November 2003	3. Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit

seit 01. 03. 2004	Ärztin im Praktikum/Assistenzärztin in der Abteilung für Allgemein- und Unfallchirurgie der Pleißenklinik Werdau
-------------------	--

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Prof. Dr. U. Claussen, Prof. Dr. S. Patt, PD Dr. F. v. Eggeling, Dr. T. Liehr, Dr. I. Loncarevic, Dr. A. Heller, Dr. A. Nietzel, S. Michel,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- daß ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Zwickau, am 24. April 2005

Antje Kaiser, Verfasserin